UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Desenvolvimento de método de triagem de substâncias
psicoativas em amostras de cabelo através de técnicas
imunológicas**

FLÁVIA LOPES ROVERI

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador – Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo

2017

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Desenvolvimento de método de triagem de substâncias
psicoativas em amostras de cabelo através de técnicas
imunológicas**

FLÁVIA LOPES ROVERI

Versão corrigida da dissertação conforme resolução CoPGr 6018
Original encontra-se disponível no Serviço de Pós-Graduação da FCF/USP

Dissertação para obtenção do Título de Mestre
Orientador – Prof. Dr. Mauricio Yonamine

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Roveri, Flávia Lopes
R874d Desenvolvimento de método de triagem de substâncias psicoativas
em amostras de cabelo através de técnicas imunológicas / Flávia
Lopes Roveri. -- São Paulo, 2016.
130p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Yonamine, Mauricio

1. Análise toxicológica 2. Cabelo : Análise I. T. II. Yonamine,
Mauricio, orientador.

615.907 CDD

FLÁVIA LOPES ROVERI

**Desenvolvimento de método de triagem de substâncias
psicoativas em amostras de cabelo através de técnicas
imunológicas**

Comissão Julgadora da Dissertação para obtenção do Título de Mestre

Prof. Dr. Mauricio Yonamine
orientador/presidente

Dra. Carolina Dizioli Rodrigues Oliveira
1o. examinador

Dra. Profa. Alice Aparecida da Matta Chasin
2o. examinador

Dr. Prof. Felipe Rebello Lourenço
3o. examinador

São Paulo, 07 de fevereiro de 2017.

“A mente que se abre a uma nova ideia
jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

Aos meus pais, Evandro e Tânia, por sempre me darem todo apoio, amor e incentivo necessários para minha caminhada profissional. Vocês são o meu maior exemplo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida e por me permitir chegar até aqui sempre iluminando as minhas escolhas.

A toda a minha família, por todo amor, dedicação e orações. O apoio de vocês sempre me deu coragem e determinação para seguir em frente.

Ao meu professor e orientador Mauricio Yonamine por ter me dado a oportunidade mais feliz da minha vida. Obrigada pela confiança, paciência, ensinamentos e amizade. Serei eternamente grata!

Ao Laboratório de Análises Toxicológicas – LAT USP pela experiência adquirida e a todos os seus funcionários, em especial a Beatriz, por todo acolhimento, companheirismo e ensinamentos até hoje.

Aos funcionários Samantha, Ângelo e D. Luzia, por sempre estarem prontos a me ajudar, em qualquer situação.

Aos meus queridos amigos de laboratório Menck, Tiago, Anax, Kátia, Jefferson, Flávia, Iolana, Marcelo e Alexandre por todos os momentos divididos, ensinamentos compartilhados e aventuras analíticas vividas. Obrigada por tudo.

Às minhas *FUFs*, Ana, Sarinha, Gabis, Maita e Idy por todos os dias de convívio. Vocês me deram a força necessária para eu chegar até aqui. Juntas somos muito mais que um laboratório.

Ao meu aluno de IC Wagner por sempre estar pronto para me ajudar, especialmente com os computadores do laboratório, muito obrigada.

Aos professores Ernani, Elisabeth e Tânia por contribuíram imensamente para meu crescimento e ao professor Felipe Lourenço pela imensa ajuda.

À minha professora de graduação Luciane, por me apresentar a toxicologia e por me incentivar na vida acadêmica.

Aos meus amigos/irmãos Daniel, Natália, Thiago e Letícia que me acompanharam nesta caminhada, ouvindo meus desabafos, me divertindo e me incentivando a cada dia.

À Radox, em especial a Saskia, e a Vila Serena pela parceria e contribuição neste trabalho.

À Universidade de São Paulo e a agência de fomento CAPES pelo suporte acadêmico e financeiro.

APOIO FINANCEIRO

CAPES - Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior.

RESUMO

ROVERI, F. L. **Desenvolvimento de método de triagem de substâncias psicoativas em amostras de cabelo através de técnicas imunológicas.** 2016. 130f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O consumo abusivo de substâncias psicoativas é um problema de saúde pública, sendo as análises toxicológicas uma importante ferramenta para seu controle. Atualmente, o cabelo está entre as mais utilizadas matrizes biológicas para análise de substâncias psicoativas, devido principalmente ao seu amplo período de detecção. As análises toxicológicas de drogas de abuso podem ser conduzidas através de técnicas de triagem seguidas por técnicas confirmatórias para os resultados positivos. No presente trabalho, foi avaliada a adaptação do método de triagem para substâncias psicoativas em cabelo a partir do *kit* para imunoensaio em sangue DOA I WB P com a tecnologia Biochip - Randox Laboratórios®. As análises foram realizadas para as classes das anfetaminas, benzodiazepínicos, barbitúricos, cocaína, opiáceos e canabinoides. Os ensaios imunológicos seguiram a partir da análise de amostras reais, adicionadas e artificiais sendo todas previamente confirmadas por técnica de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Pelos resultados obtidos pôde-se observar que o *kit* não apresenta capacidade de analisar a classe de canabinoides. Já para os opiáceos, barbitúricos e anfetamina a aplicação do imunoensaio se mostrou promissora, entretanto a falta de amostras reais positivas impossibilitou a validação do método. Para cocaína, possíveis fontes de contaminação podem ter alterado os resultados impossibilitando a sua avaliação. Benzodiazepínicos, MDMA e metanfetamina apresentaram efeito matriz significativo, não havendo diferenciação entre amostras positivas e negativas. Desta forma, a validação e aplicação do método de imunoensaio para amostras de cabelo não foi possível devido ao elevado efeito de matriz apresentado pelo *kit* e a falta de amostras reais positivas impossibilitando a validação de parâmetros como sensibilidade, especificidade e exatidão.

Palavras chave: análise em cabelo, matrizes alternativas, triagem, drogas de abuso, imunoensaio.

ABSTRACT

ROVERI, F. L. **Development of screening method for the detection of psychoactive substances in hair samples using immunological techniques.** 2016. 120f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The abuse of psychoactive substances is a public health problem and toxicological analysis is an important tool for its control. Currently, hair is among the most widely used biological matrices psychoactive substance analysis, mainly for its detection window. The toxicological analysis of drugs of abuse may be conducted by screening techniques followed by confirmation techniques for positive results. In the present work, an adaptation of a screening method for psychoactive substances in hair was evaluated from the DOA I WB P blood immunoassay kit with a Biochip - Randox Laboratories® technology. The analysis were performed for the drug classes of amphetamines, benzodiazepines, barbiturates, cocaine, opiates and cannabinoids. The immunological assays followed the analysis of real, spiked and artificial samples that have been previously confirmed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) technique. From the results obtained it was observed that the kit does not sufficient capacity for analysis of cannabinoids. As for opiates, barbiturates and amphetamines, the immunoassay application proved to be promising. However, a lack of real samples made it impossible to validate the method. For cocaine, finding sources of contamination may have altered the results, making it impossible to evaluate. Benzodiazepines, MDMA and methamphetamine showed significant matrix effect, with no difference between positive and negative samples. Thus, a validation and application of the immunoassay method for hair samples was not possible due to the high matrix effect for the kit and a lack of actual samples making it extremely difficult to validate parameters such as sensitivity, specificity and accuracy.

Key words: hair analysis, alternative matrices, screening, drugs of abuse, immunoassay.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEME	anidroecgonina metil ester
ANF	Anfetamina
ATFA	Anidrido trifluoracético
BARB	Barbitúricos
BENZ	B enzodiazepínicos
BSTFA	N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
BZE	Benzoilecgonina
CA	Concentração alta
CB	Concentração baixa
CCI	Centro de Controle de Intoxicações
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CM	Concentração média
COCA	Cocaína
CONTRAN	Conselho Nacional de Transito
CV%	Coeficiente de variação em porcentagem
d	Deuterado
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOA I WB P	do inglês - <i>Drugs of Abuse I Whole Blood Plus</i> , drogas de abuso I sangue total plus
DP	Desvio padrão
DTR	do inglês - <i>Discrete Test Regions</i> , regiões de testes discretos
E	Especificidade
EI	do inglês - <i>Electron Ionization</i> , ionização por elétrons
ELISA	do inglês - <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> , ensaio de imunoabsorção enzimática
EUA	Estados Unidos da América
EWDTs	do inglês - <i>European Workplace Drug Testing Society</i> , sociedade europeia de teste de drogas em ambiente de trabalho
EX	Exatidão
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FPIA	do inglês - <i>Fluorescence Polarization Immunoassay</i> , imunoensaio por fluorescência polarizada
GC	do inglês – <i>Gas Chromatography</i> , cromatografia em fase gasosa
GC-MS	do inglês – <i>Gas chromatography–mass spectrometry</i> , cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
HFBA	Ácido heptafluorobutírico
HRP	do inglês - <i>Horseradish peroxidase</i>
IUPAC	do inglês - <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> , união internacional de Química pura e aplicada
LC	do inglês – <i>Liquid chromatography</i> , cromatografia líquida
LC-MS	do inglês – <i>Liquid chromatography-mass spectrometry</i> , cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
LLE	do inglês – <i>Liquid phase extraction</i> , extração em fase líquida
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LPME	do inglês: <i>liquid-phase microextraction</i> , microextração em fase líquida
MBTFA	N-metil-bis-trifluoroacetamida
MDA	3,4-metilenodioxianfetamina
MDMA	3,4-metilenodioximetanfetamina
META	Metanfetamina
MS	do inglês – <i>Mass spectrometry</i> , espectrometria de massas
MSTFA	N-metil-N- (trimetilsilil) trifluoroacetamida
NIST	do inglês - <i>National Institute of Standards and Technologies</i> , instituto nacional de padrões e tecnologia
OIT	Organização Internacional do Trabalho
OPI	Opiáceos
PFPA	Anidrido pentafluorpropionico
PFPOH	Pentafluoropropanol
r²	Coeficiente de determinação
RD	Redução de danos
RIA	do inglês - <i>Radioimmunoassay</i> , radioimunoensaio
S	Seletividade

SAHMSA	do inglês - <i>Substance Abuse and Mental Health Services Administration</i> , serviços administrativos de substâncias de abuso e saúde mental
SBTOX	Sociedade Brasileira de Toxicologia
SIM	do inglês - <i>Selected Ion Monitoring</i> , monitoramento seletivo de íons
SNGPC	Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados
SPDE	do inglês – <i>Solid phase dynamic extraction</i> , extração dinâmica em fase sólida
SoHT	do inglês - <i>Society of Hair Testing</i> , sociedade de teste em cabelo
SPE	do inglês – <i>Solid phase extraction</i> , extração em fase sólida
SPME	do inglês – <i>Solid-phase microextraction</i> , microextração em fase sólida
SWGTOX	do inglês - <i>Scientific Working Group for Forensic Toxicology</i> , grupo científico de trabalho de toxicologia forense
TCMS	Trimetilclorosilano
TFA	Ácido trifluoracético
THC	Δ^9 -tetraidrocanabinol
THCCOOH	Ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico
TMAH	Hidróxido de tetrametilamônio
TMS	Trimetilsilil
UNODC	do inglês - <i>United Nations Office on Drugs and Crime</i> , escritório das nações unidas sobre drogas e crime
UPLC	do inglês – <i>Ultra performance liquid chromatography</i> , cromatografia líquida de ultra performance
VPP	Valor preditivo positivo
VPN	Valor preditivo negativo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura capilar.....	13
Figura 2: Fatores de incorporação de substâncias psicoativas no cabelo.....	16
Figura 3: Passos práticos da análise de cabelo.....	17
Figura 4: Representação esquemática da SPE.....	20
Figura 5: Esquema da LPME no sistema trifásico.....	21
Figura 6: Biochip - Imunoensaio competitivo heterogêneo quimioluminescente....	29
Figura 7: Representação geométrica da disposição das regiões de teste – DTR.....	31
Figura 8: Cromatograma obtido pela análise de cabelo por LPME adicionado dos padrões de anfetaminas na concentração de 5,0 ng/mg. A: Anfetamina-d5 e anfetamina (TR: 8,36); B: Metanfetamina (TR: 9,64); C: MDA (TR: 12,43); D: MDMA-d5 e MDMA (TR: 13,54 e 13,55). Legenda: TR – tempo de retenção.....	50
Figura 9: Cromatograma obtido pela análise de cabelo por LPME adicionado dos padrões de barbitúricos na concentração de 5,0 ng/mg. A: Pentobarbital-d5 e pentobarbital (TR: 5,82 e 5,85); B: Secobarbital-d5 e secobarbital (TR: 6,15 e 6,18); C: Fenobarbital-d5 e fenobarbital (TR: 7,55 e 7,57).....	52
Figura 10: Cromatograma obtido pela análise de cabelo por SPE adicionado dos padrões de benzodiazepínicos na concentração de 5,0 ng/mg. A: Diazepam-d5 e diazepam (TR: 7,08 e 7,09); B: Nordiazepam (TR: 7,24); C: Oxazepam (TR: 8,29).....	54
Figura 11: Cromatograma obtido pela análise de cabelo por LPME adicionado dos padrões cocaína na concentração de 5,0 ng/mg. A: AEME (TR: 6,85); B: Cocaína-d3 e cocaína (TR: 12,92 e 12,94); C: Cocaetileno-d3 e cocaetileno (TR: 13,40 e 13,41); D: Benzoilecgonina-d3 e benzoilecgonina (TR: 14,82 e 14,83).....	57
Figura 12: Cromatograma obtido pela análise de cabelo por SPE adicionado dos padrões de opiáceos na concentração de 5,0 ng/mg. A: Codeína-d3 e codeína (TR: 7,79 e 7,8); B: Morfina-d3 e morfina (TR: 8,24 e 8,25).....	61
Figura 13: Representação esquemática do procedimento de análise para o kit DOA I WB Plus.....	70
Figura 14: Representação da interpretação final dos resultados encontrados para os ensaios de reatividade cruzada e interferência da matriz.....	84

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Avaliação do efeito matriz a partir da análise por digestão alcalina seguida de LPME para amostras zero, amostras de 10 mg e amostra de 25 mg.....	77
Gráfico 2: Resultados da capacidade de extração dos analitos por acetonitrila em amostras artificiais.....	80
Gráfico 3: Resultados da capacidade de extração dos analitos por metanol em amostras artificiais.....	80
Gráfico 4: Comparação entre a resposta de amostras controle de anfetamina e as amostras controle para as demais drogas, em seus respectivos ensaios.....	81
Gráfico 5: Comparação entre a resposta de amostras controle de metanfetamina e as amostras controle para as demais drogas, em seus respectivos ensaios.....	81
Gráfico 6: Comparação entre a resposta de amostras controle de MDMA e as amostras controle para as demais drogas, em seus respectivos ensaios.....	82
Gráfico 7: Comparação entre a resposta de amostras controle de barbitúrico e as amostras controle para as demais drogas, em seus respectivos ensaios.....	82
Gráfico 8: Comparação entre a resposta de amostras controle de benzodiazepínico e as amostras controle para as demais drogas, em seus respectivos ensaios.....	82
Gráfico 9: Comparação entre a resposta de amostras controle de cocaína e as amostras controle para as demais drogas, em seus respectivos ensaios.....	82
Gráfico 10: Comparação entre a resposta de amostras controle de opiáceos e as amostras controle para as demais drogas, em seus respectivos ensaios.....	83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais propriedades físico-químicas das substâncias de interesse neste estudo.....	7
Tabela 2: Comparação entre as matrizes sangue, urina e cabelo.....	11
Tabela 3: Alguns trabalhos já publicados sobre detecção de substâncias psicoativas em amostras de cabelo.....	22
Tabela 4: Valores de cut-off para substâncias e seus produtos de biotransformação em cabelo.....	28
Tabela 5: Quantidade de padrão analítico adicionado em 1 grama de cabelo, para cada alíquota.....	36
Tabela 6: Níveis de controles para ensaios de precisão e exatidão.....	48
Tabela 7: Parâmetros de validação do método desenvolvido para a determinação de barbitúricos em amostras de cabelo.....	52
Tabela 8: Parâmetros de validação do método desenvolvido para a determinação de cocaína e seus produtos de biotransformação em amostras de cabelo.....	57
Tabela 9: Resultados referentes aos ensaios de linearidade do método proposto.....	59
Tabela 10: Parâmetros de validação do método desenvolvido para a determinação de opiáceos em amostras de cabelo.....	61
Tabela 11: Resultados da análise das amostras de cabelo de voluntários que relataram consumo das substâncias de interesse.....	63
Tabela 12: Resultados obtidos pela análise de cabelo artificial adicionado de padrões analíticos de interesse.....	66
Tabela 13: Métodos de extração/digestão avaliados pelo método de imunoensaio...	69
Tabela 14: Características do painel de escolha - DOA I WB P.....	73
Tabela 15: Resultados obtidos por imunoensaio de amostras de sangue total adicionadas dos padrões analíticos de interesse nos valores de <i>cut-off</i> para triagem.....	75
Tabela 16: Média dos resultados, em triplicata, do imunoensaio para detecção de anfetaminas em amostras de cabelo adicionadas na concentração de <i>cut-off</i>	76
Tabela 17: Média dos resultados, em triplicata, do imunoensaio para detecção de cocaína e morfina em amostras de cabelo adicionadas na concentração de <i>cut-off</i> ...	78
Tabela 18: Resultados para os ensaios de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) e exatidão (EX).....	85

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 O impacto do abuso de substâncias psicoativas no Brasil e no mundo.....	3
2.2. Principais substâncias psicoativas consumidas no Brasil.....	4
2.3 Análises toxicológicas de substâncias psicoativas em cabelo.....	10
2.4 Características da rede capilar.....	12
2.4.1 Anatomia e estrutura do cabelo.....	12
2.4.2 Ciclo de crescimento capilar.....	13
2.4.3 Mecanismos de incorporação de xenobióticos no cabelo e os fatores de contaminação externa	14
2.5 Aspectos analíticos para análises em cabelo.....	16
2.5.1 Procedimentos pré-analíticos.....	17
2.5.1.1 Amostragem e armazenamento.....	17
2.5.1.2 Descontaminação.....	18
2.5.1.3 Procedimentos de digestão/extração da matriz.....	18
2.5.1.4 Procedimentos de <i>clean up</i>	19
2.5.2 Procedimentos analíticos.....	26
2.5.2.1 Técnicas imunológicas.....	26
2.5.2.1.1 <i>The Evidence Investigator™: Drugs of Abuse I Whole Blood Plus</i> <i>Assays – Randox</i>	29
3 OBJETIVOS.....	32
4 PLANO DE TRABALHO/ DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	33
5 MATERIAL.....	34
5.1 Equipamentos e Programas.....	34
5.2 Reagentes e outros materiais.....	34
5.3 Padrões.....	34
5.4 Coleta e armazenamento de amostras.....	35
5.5 Preparo de amostras.....	35
5.6 Preparo de cabelo artificial.....	36
PARTE 2 – ENSAIOS CONFIRMATÓRIOS.....	38
6 MÉTODOS	39
6.1 Confirmação de anfetaminas por GC-MS.....	39
6.1.1 Método de extração.....	39
6.1.2 Condições cromatográficas.....	39
6.1.3 Condições do espectrômetro de massas.....	40
6.5 Confirmação de barbitúricos por GC-MS.....	40
6.2.1 Método de extração.....	40
6.2.2 Condições cromatográficas.....	41
6.2.3 Condições do espectrômetro de massas.....	41
6.3 Confirmação de benzodiazepínicos por GC-MS.....	42

6.3.1 Método de extração.....	42
6.3.2 Condições cromatográficas.....	42
6.3.3 Condições do espectrômetro de massas.....	43
6.4 Confirmação de cocaína e seus produtos de biotransformação por GC-MS.	43
6.4.1 Método de extração.....	43
6.4.2 Condições cromatográficas.....	44
6.4.3 Condições do espectrômetro de massas.....	44
6.5 Confirmação de opiáceos por GC-MS.....	45
6.5.1 Método de extração.....	45
6.5.2 Condições cromatográficas.....	45
6.5.3 Condições do espectrômetro de massas.....	46
6.6 Validação de métodos.....	46
7 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
7.1 Confirmação de anfetaminas por GC-MS.....	49
7.2 Confirmação de barbitúricos por GC-MS.....	50
7.3 Confirmação de benzodiazepínicos por GC-MS.....	54
7.4 Confirmação de cocaína e seus produtos de biotransformação por GC-MS.	55
7.5 Confirmação de opiáceos por GC-MS.....	59
7.6 Resultado das análises confirmatórias em amostras reais.....	62
7.7 Resultado das análises toxicológicas em cabelo em amostras artificiais.....	66
PARTE 2 – ENSAIOS IMUNOLÓGICOS.....	68
8 MÉTODOS.....	69
8.1 Triagem por imunoensaio.....	69
8.2 Avaliação dos dados.....	70
8.2.1 Análise Estatística.....	70
8.2.2 Validação do método.....	71
9 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	72
9.1 Avaliação preliminar.....	72
9.2 Avaliação dos métodos de extração e os efeitos matriz.....	76
10 CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88
ANEXOS.....	101
Anexo A – Parecer do CEP da FCF-USP.....	101
Anexo B – Questionário aplicado aos doadores das amostras de cabelo.....	103
Anexo C – Histórico escolar.....	104
Anexo D – Currículos Lattes.....	106
Anexo E – Publicação de Artigo Científico.....	113

1. INTRODUÇÃO

Há mais de 200 anos, a sociedade vem sofrendo os impactos relacionados ao consumo abusivo de substâncias psicoativas (CONE, 2001). Segundo a *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC, 2016a) estima-se que em 2014, cerca de 247 milhões pessoas, (5,2% da população mundial) com idade entre 15-64 anos tenham usado alguma substância psicoativa ao menos uma vez na vida. Já no Brasil, a última estimativa oficial sobre a prevalência do uso de drogas foi em 2012, apontando o uso de tranquilizantes (12,1%), maconha (11,1%) e cocaína (8,2%) como as mais utilizadas, seguidos do consumo de outros estimulantes (4,1%), esteroides (1,4%), opiáceos (1,3%) e *ecstasy* (1,2%) (INPAD, 2014).

Embora os padrões de consumo sejam muito diferentes ao redor do mundo, o impacto desta prática sobre a saúde e a segurança dos indivíduos e na estrutura social de uma nação tem sido universalmente negativo. Desta forma, a sociedade vem lutando para controlar e até mesmo banir este consumo indevido com atividades relacionadas à legislação e ao tratamento de usuários como, por exemplo, políticas de redução de danos (CONE, 2001).

Neste cenário, as análises toxicológicas podem contribuir para controlar ou até mesmo coibir o abuso dessas substâncias, sendo empregadas em diferentes contextos, como no monitoramento em ambientes de trabalho e clínicas de reabilitação, em casos judiciais de custódia de filhos, no controle antidopagem, em investigações criminais, entre outros (CURTIS; GREENBERG, 2008).

As análises toxicológicas são comumente realizadas em matrizes biológicas convencionais como sangue e urina; entretanto muitos estudos têm demonstrado a utilidade de amostras biológicas alternativas, como por exemplo, o cabelo (CONE, 2001). Desta forma, as análises realizadas em amostras de cabelo, como uma matriz alternativa ou complementar, têm se expandido em todo o espectro das investigações toxicológicas (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

O cabelo é um tecido resistente, estável, menos afetado por adulterantes ou pela abstinência de curto prazo e tem a vantagem sobre matrizes convencionais de ser capaz de confirmar a exposição em longo prazo - semanas a meses - dependendo do comprimento do cabelo analisado (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

As primeiras substâncias analisadas nesta matriz foram os metais pesados por meio de espectroscopia de absorção atômica. As análises para as substâncias orgânicas, especialmente fármacos, apareceram vários anos mais tarde, devido à falta de sensibilidade das técnicas analíticas (BALIKOVA, 2005; VILLAIN et al., 2004). Em 1979, Baumgartner et al. (1979) publicaram o primeiro trabalho sobre a utilização de radioimunoensaio (RIA) para detecção de morfina em cabelo, dando início às análises de substâncias psicoativas em amostras de cabelo.

A partir deste ponto as análises em cabelo cresceram substancialmente e consequentemente, novas técnicas analíticas vêm sendo desenvolvidas, principalmente as que empregam cromatografia acoplada à espectrometria de massas (BALIKOVA, 2005). Entretanto, visto que a grande maioria dos resultados são reportados como negativos, existe um grande apelo para o desenvolvimento de metodologias que sejam mais baratas e simples para procedimentos de triagem, como por exemplo os testes de imunoensaio. Porém, poucos são os trabalhos sobre esta ferramenta em ensaios de triagem e menor ainda é a comercialização desta tecnologia no Brasil (BAUMGARTNER et al., 2012).

Diante deste cenário, o objetivo deste trabalho foi a avaliação da aplicação do método de triagem para substâncias psicoativas em cabelo a partir da adaptação do *kit* para imunoensaio em sangue *Drugs of Abuse I Whole Blood Plus* (DOA I WB P) com a tecnologia Biochip - Randox Laboratórios®.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O impacto do abuso de substâncias psicoativas no Brasil e no mundo

Nos últimos anos, o consumo indevido de substâncias psicoativas tem sido tratado pela comunidade internacional como um grande problema para o desenvolvimento sustentável das nações. Eventos relacionados ao cultivo, tráfico até o abuso dessas substâncias atingem a sociedade em todas as suas ramificações, sejam elas sociais, políticas ou econômicas (OPAS, 2012; UNODC, 2016a).

Segundo a UNODC (2016a) estima-se que em 2014, 247 milhões de pessoas fizeram uso de alguma uma substância psicoativa ao menos uma vez na vida. Entre essas pessoas, 29 milhões apresentaram algum transtorno de saúde, sendo o HIV responsável por 1,6 milhões de casos. Já o número de mortes relacionado ao uso de drogas atingiu mais de 200 mil pessoas entre 15 e 64 anos no mesmo ano (UNODC, 2016a).

O uso indevido de substâncias psicoativas também está relacionado não só a casos de morte prematura como a redução drástica de qualidade de vida pelos usuários. Degenhardt et al. (2013) revelam que, em 2013, 3,6 milhões de anos de vida foram perdidos por morte prematura e 16,4 milhões de anos de vida foram vividos com incapacidade no mundo.

As causas de morte e incapacidade também podem ser relacionadas aos acidentes de trânsito ocasionados pela influência de álcool e drogas. Em 2013, de acordo com o relatório *Drug Use and Road Safety*, o consumo de drogas ilícitas foi responsável por cerca de 40 mil acidentes rodoviários em todo o mundo, sendo o uso de anfetaminas responsável por metade dos casos (WHO, 2016). Apesar das evidências negativas desta prática, cerca de 10 milhões de pessoas relataram conduzir sob a influência destas substâncias nos Estados Unidos em 2014 (CBHSQ, 2015).

Casos de violência também já foram relacionados ao uso de álcool e drogas embora esta relação ainda não seja tão compreendida. Isso porque essas substâncias podem influenciar atos de violência de diferentes maneiras, sendo reportadas como “facilitadoras” seja de violência interpessoal, como os casos de violência doméstica, infantil ou urbana, de violência "econômico-compulsivo", onde os indivíduos cometem

crimes para sustentar o próprio consumo ou de violência relacionada ao tráfico em atos para impor pagamento, punições, etc. (UNODC, 2013).

Outro seguimento atingido pelo uso inapropriado de substâncias psicoativas é o ambiente de trabalho. Alguns fatores como queda de produção, atrasos, absenteísmos, acidentes e indenizações prejudicam a sustentabilidade das empresas e aumentam os gastos com saúde e previdência (UNODC, 2016b).

Estatísticas da Organização Mundial do Trabalho (OIT) apontam o Brasil entre os cinco primeiros do mundo em número de acidentes no trabalho no ano de 2013. Deste total, cerca de 20% dos casos está relacionado a pessoas sob influência de alguma substância psicoativa (OIT, 2015).

Diante desta problemática, o desenvolvimento e a implantação de programas para prevenção, controle e monitoramento do uso dessas substâncias pela população são temas de constante discussão. Qualquer política adotada deve basear-se em estratégias que visem à qualidade de vida, à preservação das relações interpessoais, à segurança e à produtividade dos indivíduos (OPAS, 2012).

Embora as políticas de prevenção sejam uma das principais ações frente ao combate antidrogas, o Ministério da Saúde vem também apoiando a formação de políticas públicas que visem a chamada “Redução de Danos” (RD). A RD tem como objetivo reduzir os danos associados ao uso de substâncias psicoativas e contribuir para transformação da visão do mundo e a postura da sociedade diante do problema das drogas (PASSOS; SOUZA, 2011).

2.2. Principais substâncias psicoativas consumidas no Brasil

O primeiro passo para se estabelecer políticas de saúde pública que visem o combate contra as drogas é saber quais delas afligem a população em estudo e como afligem. Apesar da escassez de dados, no Brasil, a última estimativa oficial sobre a prevalência do uso de drogas foi em 2012, apontando o uso de tranquilizantes (12,1%), maconha (11,1%) e cocaína (8,2%) como as mais utilizadas, seguidos do consumo de outros estimulantes (4,1%), esteroides (1,4%), opiáceos (1,3%) e ecstasy (1,2%) (INPAD, 2014).

As anfetaminas são substâncias estimulantes do sistema nervoso central (SNC), utilizadas principalmente para o tratamento de obesidade e narcolepsia. Tanto a

anfetamina quanto a metanfetamina atuam sobre a liberação de neurotransmissores como dopamina e norepinefrina, sendo responsáveis por efeitos como aumento da atividade motora, euforia, excitação, insônia, anorexia etc (CIRIMELE, 2007; RANG et al., 2012). A 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), embora seja um derivado anfetamínico, é responsável pela liberação principalmente de serotonina, o que caracteriza seus efeitos psicodélicos e alucinógenos (DIEHL; CORDEIRO; LARANJEIRA, 2011; RANG et al., 2012). Os compostos anfetamínicos, excluindo a MDMA, constituem o segundo grupo mais comumente utilizado de substâncias ilícitas em todo o mundo, com a estimativa de aproximadamente 35,7 milhões de usuários em 2014. Já a MDMA apresentou cerca de 19,4 milhões de usuários no mesmo ano (UNODC, 2016a).

Já os barbitúricos pertencem à família de fármacos derivados do ácido barbitúrico responsáveis pela depressão do SNC. Dependendo da sua fórmula e dosagem, podem apresentar efeito sedativo, hipnótico, anticonvulsivo ou anestésico (RANG et al., 2012). No Brasil, casos de intoxicação por barbitúricos, especialmente por fenobarbital, foram reportados pelos Centros de Controle de Intoxicação (CCI) das cidades de São Paulo e Londrina. Em São Paulo, o uso de fenobarbital foi responsável por 3,83% dos casos de intoxicação em 2001 (BONILHA et al., 2005). Já em Londrina, foi responsável por 43,4% dos casos de tentativa de suicídio por anticonvulsivantes no período entre 1997 a 2007. (BERNARDES; TURINI; MATSUO, 2010). Nos Estados Unidos, de acordo com dados publicados em 2011 pela *Substance Abuse and Mental Health Services Administration* – SAMHSA (2011), foram realizados aproximadamente 18 mil atendimentos de emergência envolvendo o uso não prescrito de barbitúricos.

Os benzodiazepínicos também são fármacos depressores do SNC, sendo estes os medicamentos psicotrópicos mais prescritos no mundo. Estão entre seus principais efeitos a redução de ansiedade e agressividade, indução de sono e sedação, efeito anticonvulsivante e amnésia anterógrada (DIEHL; CORDEIRO; LARANJEIRA, 2011; RANG et al., 2012). Devido a estes efeitos esta classe de medicamentos também é utilizada como “drogas facilitadoras de crime”, pois incapacitam as vítimas, como, por exemplo, em casos de abuso sexual (CHÈZE; VILLAIN; PÉPIN, 2004). No Brasil, segundo dados do Boletim de Farmacoepidemiologia do Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados (SNGPC), em 2011 foram vendidos mais de 19,4 milhões de unidades de benzodiazepínicos (BRASIL, 2011). Em 2011, os Estados

Unidos apontaram essa classe de medicamentos como a responsável por 66 mil casos de suicídio e 357 mil casos de atendidos em centros de emergência (SAMHSA, 2011).

A *Cannabis sativa*, uma das mais antigas plantas cultivadas no mundo tem seus efeitos eufóricos devido principalmente ao seu princípio psicoativo o Δ^9 -tetraidrocanabinol, também conhecido como THC (UHL, 2007). O THC atua principalmente no SNC, produzindo uma mescla de efeitos psicodélicos e depressores, como sensações de relaxamento e bem-estar, impressões de consciência sensorial aguçada, com sons e visões mais intensos, entre outros (DIEHL; CORDEIRO; LARANJEIRA, 2011; RANG et al., 2012). Estima-se que aproximadamente 183 milhões de pessoas já utilizaram *Cannabis* de alguma forma, o que corresponde a 3,8% da população mundial (UNODC, 2016a). No Brasil, este valor chega a 11,1% da população (INPAD, 2014).

Outra planta de interesse é a *Erythroxylon coca*, que tem como produto de extração de suas folhas a cocaína. Seu abuso se deve a sua ação estimulante no SNC através da ação inibitória na recaptação de neurotransmissores como a dopamina e a norepinefrina, ocasionado assim efeitos simpatomiméticos e psicomotores potencializados. Estes efeitos podem ser traduzidos em euforia, loquacidade, aumento da atividade motora, ampliação do prazer, entre outros (FERREIRA; MARTINIB, 2001; RANG et al., 2012). Em 2014, a UNODC (2016a) relatou 18,3 milhões de usuários de cocaína ao redor do mundo. No Brasil, o uso de *crack* já atinge cerca de 3,2 milhões de pessoas. A estimativa em número absoluto leva à suposição de que o Brasil é, provavelmente, o segundo maior mercado consumidor dessa substância, ficando atrás apenas dos Estados Unidos (ABDALLA et al., 2014).

Sobre os opiáceos, como a morfina e a codeína, são os medicamentos mais eficazes disponíveis para o tratamento de dor severa. No entanto, por possuírem elevado potencial de abuso, podem ser utilizados de maneira ilícita, assim como a heroína (CURTIS; GREENBERG, 2008). Este potencial de abuso pode ser relacionado aos efeitos de analgesia e sedação, mas principalmente aos efeitos de euforia que esta classe de substâncias provoca (YEGLES; WENNING, 2007; RANG et al., 2012). O uso de opiáceos, incluindo heroína e os medicamentos de uso prescrito, é estimado em 33 milhões de pessoas no mundo (UNODC, 2016a). No Brasil, a prevalência em 2012 chegou a 1,3% da população (INPAD, 2014).

Outras informações relevantes sobre as classes de interesse são apresentadas na **tabela 1** incluindo estrutura química, fórmula molecular e demais propriedades físico-químicas.

Vale ressaltar que estas informações não somente são apresentadas para os compostos inalterados, como também para alguns de seus produtos de biotransformação, devido à importância nas análises toxicológicas, sendo eles a 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA) para o MDMA, o nordiazepam e o oxazepam para o diazepam, o ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico para o THC e a benzoilecgonina, a anidroecgonina metil ester e o cocaetileno para cocaína.

Tabela 1: Principais propriedades físico-químicas das substâncias de interesse neste estudo.

Continua

Substâncias	Estrutura química	Fórmula e peso molecular	pKa	LogP
Anfetamina		C ₉ H ₁₃ N PM:135,2	9,9	1,8
Metanfetamina		C ₁₀ H ₁₅ N PM: 149,2	9,87	2,07
MDMA		C ₁₁ H ₁₅ NO ₂ PM: 193,2	9	1,81
MDA		C ₁₀ H ₁₃ NO ₂ PM:179,2	9,67	1,64
Fenobarbital		C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O ₃ PM: 232,2	7,4	1,5

Continuação

Substâncias	Estrutura química	Fórmula e peso molecular	pKa	LogP
Secobarbital		$C_{12}H_{18}N_2O_3$ PM: 238,3	7.9	2
Pentobarbital		$C_{11}H_{18}N_2O_3$ PM: 226,2	8	1,9
Diazepam		$C_{16}H_{13}ClN_2O$ PM: 284,8	1. 3,5 2. 3,3	2,8
Nordiazepam		$C_{15}H_{11}ClN_2O$ PM: 270,8	1. 3,5 2. 12	2,93
Oxazepam		$C_{15}H_{11}ClN_2O_2$ PM: 286,7	1. 1,7 2. 11,6	2,24
Δ^9 -tetraidrocanabinol		$C_{21}H_{30}O_2$ PM: 314,4	10,6	6,97

Continuação

Substâncias	Estrutura química	Fórmula e peso molecular	pKa	LogP
Ácido 11-nor-Δ ⁹ -tetraidrocanabinol carboxílico		C ₂₁ H ₂₈ O ₄ PM:344,4	4,5	5,1
Cocaína		C ₁₇ H ₂₁ NO ₄ PM: 303,3	8,6	2,3
Benzoilecgonina		C ₁₆ H ₁₉ NO ₄ PM: 289,3	1. 3,2 2. 10,1	1,3
Anidroecgonina metil ester		C ₁₀ H ₁₅ NO ₂ PM: 181,3	-	-
Cocaetileno		C ₁₈ H ₂₃ NO ₄ PM: 317,4	8	-
Morfina		C ₁₇ H ₁₉ NO ₃ PM: 285,4	1. 8,0 2. 9,9	0,1

Conclusão

Substâncias	Estrutura química	Fórmula e peso molecular	pKa	LogP
Codeína		C ₁₈ H ₂₁ NO ₃ PM: 299,3	8,2	0,6

Legenda: PM – peso molecular; pka – constante de ionização; LogP – coeficiente de partição (Fonte: MOFFAT et al., 2011; LEVINE, 1999; KARSCHNER et al., 2009; FEITOSA; SODRÉ; MALDANER, 2013).

2.3 Análises toxicológicas de substâncias psicoativas em cabelo

As análises toxicológicas são uma ferramenta imprescindível para o controle e monitoramento do uso abusivo de substâncias psicoativas pela sociedade e por essa razão vem sendo aprimoradas substancialmente com o passar do tempo. Entretanto nem todos os tecidos ou fluidos são adequados para as questões que podem ser impostas.

Por esta razão, durante as últimas décadas, houve um aumento de interesse no uso de matrizes biológicas alternativas para detecção de drogas de abuso. Este fato se dá principalmente as várias possibilidades e informações oferecidas por estas matrizes. Amostras convencionais, tais como urina e sangue, são indicadas sempre que a exposição recente está sob investigação. Já tecidos humanos queratinizados como o cabelo e unhas são especialmente importantes para a obtenção de dados de exposição em longo prazo (OLIVEIRA et al., 2007a).

Desta forma, o desenvolvimento e a otimização de novos métodos analíticos para detectar substâncias psicoativas no cabelo são justificáveis devido às características distintas apresentadas por esta matriz frente às demais. Entre elas podemos citar a coleta observada, não invasiva, sem constrangimento e de difícil adulteração, o armazenamento e o transporte à temperatura ambiente, e a ótima estabilidade química, que permite a detecção tanto do composto inalterado quanto de seus produtos de biotransformação (CAPLAN; GOLDBERGER, 2001; OLIVEIRA et al., 2007a). Entretanto, a principal característica desta matriz é o amplo período de

detecção, a qual permite traçar um perfil cronológico de consumo de drogas de acordo com o comprimento do cabelo analisado (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

Sendo assim, o cabelo pode ser reconhecido como a terceira principal matriz para análise de substâncias psicoativas, ao lado de sangue e urina, contribuindo como um complemento às análises toxicológicas (NAKAHARA, 1999; KINTZ, 2004). A **tabela 2** compara as características entre as matrizes sangue, urina e cabelo.

Tabela 2: Comparação entre as matrizes sangue, urina e cabelo.

Parâmetros	Sangue	Urina	Cabelo
Janela de Detecção	Horas	2-5 dias	Vários meses
Adulteração	Difícil	Possível	Muito difícil
Coleta	Invasiva	Menos Invasiva	Não invasiva
Conservação	- 20°C	4°C ou - 20°C	Temperatura Ambiente
Foco da Análise	Composto inalterado	Produtos de Biotransformação	Composto inalterado
Tipo de Medição	Parcial	Parcial	Acumulativa

(Fonte: adaptado de KINTZ, 2004).

As análises em cabelo podem ser aplicadas nos mais diferentes contextos, seja em casos forenses, como custódia de menores, divórcio, violência sexual facilitada, etc., em casos clínicos, como controle da exposição pré-natal, acompanhamento terapêutico e de centros de reabilitação, etc. e também em outros campos como no ambiente de trabalho, na emissão de licenças de armas de fogo, etc. (VOGLIARDI et al., 2015).

No Brasil, este tipo de abordagem também tem ganhado força nos últimos anos, ampliando como um todo seu campo de aplicação. Para a posse de cargos públicos é uma atividade que tem se firmado como um requisito fundamental, sendo exigida em concursos públicos federais, se estendendo a estaduais, principalmente para cargos como polícia civil e militar.

Em empresas privadas, onde as atividades desenvolvidas são de alta periculosidade, como siderúrgicas, estaleiros, petroquímicas, transportadoras, este tipo de análise também passou a ser exigido para a contratação de seus funcionários.

Entretanto, o grande alvo das análises toxicológicas em cabelo no Brasil está voltado para o cumprimento de Lei nº 13.103/2015 que torna obrigatório “exame

toxicológico com janela de detecção mínima de 90 (noventa) dias” para substâncias psicoativas que comprometam a capacidade de direção para motoristas que forem emitir ou renovar a carteira nacional de habitação nas categorias C, D e E (BRASIL, 2013a).

A tomada de decisão do Conselho Nacional de Trânsito (CONTRAN) teve início em 2013, com a resolução nº 460/2013, alegando a medida como uma ação preventiva contra os acidentes de trânsito nas estradas. Entretanto, a falta de laboratórios credenciados, de procedimentos uniformizados e a grande crítica em relação a real efetividade desta medida, em especial por toxicologistas, fez com a mesma fosse revogada 4 vezes, sendo somente colocada em prática em 2016 (LEYTON et al., 2015).

Muitos estados brasileiros, incluindo o de São Paulo, entraram com liminares que autorizavam os departamentos de trânsito estaduais a não obedecer a nova medida alegando que a fiscalização deveria ser realizada no momento em que o condutor está na estrada, pois somente assim haveria garantia de que o motorista não estaria dirigindo sob a influência de alguma substância psicoativa (CESARE, 2016).

A Sociedade Brasileira de Toxicologia (SBTOX) frente ao aumento na demanda para este tipo de análise lançou em 2015 as “Diretrizes para Análise de Substâncias Psicoativas em Cabelos e Pelos” com o objetivo de padronizar processos analíticos, desde o momento da coleta até a interpretação dos resultados, favorecendo a conformidade dos exames realizados (SBTOX, 2015).

Em países como Suécia e Itália, a análise em cabelo também é utilizada para esta finalidade, porém em contextos diferentes. Nestes países, dirigir sobre a influência de álcool ou drogas leva a suspensão da habilitação por meses, sendo a licença somente recuperada após resultado negativo da análise em cabelo (TASSONI et al., 2014; KRONSTRAND et al., 2010).

2.4 Características da rede capilar

2.4.1 Anatomia e estrutura do cabelo

Embora o cabelo pareça ter uma estrutura bastante uniforme, trata-se de uma matriz muito complexa e parcialmente conhecida. Por esta razão, a compreensão

estrutural capilar pode proporcionar a realização de análises toxicológicas em cabelo de uma maneira mais adequada (ROBBINS, 2012; HARKEY, 1993). O cabelo é uma rede polimérica, parcialmente cristalina, que contém diferentes grupos químicos funcionais (por exemplo, ácidos, bases e ligações peptídicas), constituída de proteínas, água e lipídios (HARKEY, 1993). Sua estrutura pode ser dividida em duas partes: a parte externa, representada pelos fios de cabelo, e a parte interna, representada por pequenos órgãos chamados folículos pilosos (BOUMBA; ZIAVROU; VOUGIOUKLAKIS, 2006). Os folículos pilosos estão incorporados na epiderme da pele, cercados por redes capilares densas e podem ser divididos funcionalmente em três zonas: a mais interna, onde ocorre a síntese de células de cabelo (medular), a intermediária (córtex), local de queratinização, e a zona final (cutícula), região de estabilidade do cabelo. O folículo piloso também está intimamente associado com duas glândulas, sendo elas sebácea e apócrina (HARKEY, 1993; BOUMBA; ZIAVROU; VOUGIOUKLAKIS, 2006). A estrutura capilar pode ser visualizada na **Figura 1**.

Figura 1: Estrutura capilar (Fonte: adaptado de KRONSTRAND; SCOTT, 2007).

2.4.2 Ciclo de crescimento capilar

O ciclo de crescimento capilar humano é composto por três fases distintas, conhecidas como anágena, catágena e telógena, as quais devem ser avaliadas no momento da coleta de amostra para análises toxicológicas em cabelo. Na fase anágena, fase de crescimento ativo de cabelo (cerca de 1 cm de cabelo a cada 28

dias), ocorre o fornecimento de sangue capilar em torno do folículo e consequentemente de nutrientes e quaisquer substâncias que possam estar presentes na corrente sanguínea. As substâncias são incorporadas à haste à medida que o cabelo cresce. Já na fase catágena se observa um período de transição, onde a divisão celular é interrompida e o eixo do cabelo torna-se queratinizado. Por fim, na fase telógena, o crescimento do cabelo cessa completamente, sendo apenas ancorado no folículo pela raiz (HARKEY, 1993; BOUMBA; ZIAVROU; VOUGIOUKLAKIS, 2006). Em uma pessoa saudável, 80-90% dos folículos capilares se encontram na fase anágena, 2% na fase catágena e 10-18% na fase telógena (HARKEY, 1993).

Por estas razões, o cabelo da região do vértice do couro cabeludo deve ser escolhido como amostra, pois possui a maior percentagem de folículos na fase anágena (aproximadamente 85%) e uma taxa de crescimento mais rápida, permitindo assim uma análise mais apropriada (HARKEY, 1993).

2.4.3 Mecanismos de incorporação de xenobióticos no cabelo e os fatores de contaminação externa

Os mecanismos envolvidos na incorporação de substâncias no cabelo ou os fatores que a influenciam ainda não são completamente elucidados. Acredita-se que a incorporação ocorra a partir do sangue, durante a formação do cabelo, de sebo e de suor, através das glândulas sudoríparas e sebáceas, e a partir do ambiente externo (KINTZ, 2004).

Como mecanismo geral, as substâncias são transferidas por difusão passiva da corrente sanguínea, sebo ou suor para as células em crescimento de cabelo na base do folículo e, em seguida, durante a queratogênese tornam-se fortemente ligados no interior da sua haste. Desta forma, a quantidade de substância que irá migrar para o cabelo é dependente da sua concentração, o que depende da quantidade que foi ingerida (BOUMBA; ZIAVROU; VOUGIOUKLAKIS, 2006).

Vale ressaltar que as propriedades físico-químicas das substâncias, bem como as características fisiológicas de cada indivíduo, é que irão influenciar fortemente neste mecanismo de incorporação. Desta forma, três fatores-chave devem ser levados em consideração como a lipofilicidade e basicidade da própria substância e o teor de melanina dos cabelos (VOGLIARDI et al., 2015; BACIU et al., 2015).

Substâncias lipofílicas apresentam maior afinidade para penetrar nas células capilares, sendo esta a razão dos compostos inalterados estarem presentes em maior quantidade do que seus produtos de biotransformação. Já a diferença de pH apresentada pelo sangue (7,4) e as células do bulbo capilar cabelo (3 a 5) faz com que a incorporação de substâncias básicas seja maior quando comparada com substâncias mais ácidas. Além disso, a melanina possui uma afinidade significativa pelas substâncias de caráter básico, o que proporciona uma maior incorporação em pessoas com cabelos mais escuros (PRAGST; BALIKOVA, 2005).

Além da difusão passiva, a contaminação externa também influencia na incorporação. A diferenciação entre exposição sistêmica e contaminação é freqüentemente referida como uma das limitações da análise gerando constantes discussões pela comunidade científica (HENDERSON, 1993; TSANACLIS; WICKS, 2008).

Para esta via, é dada atenção especial às drogas que podem ser fumadas tais como anfetaminas, cocaína e a maconha, que dispersas no ar, podem contribuir para a contaminação. Além disso, traços de drogas ou medicamentos em pó também podem influenciar este processo (HENDERSON, 1993; TSANACLIS; WICKS, 2008).

Afim de minimizar o problema algumas práticas são recomendadas pela comunidade científica no momento de se conduzir as análises e interpretar os resultados. Estas práticas se resumem a procedimentos de descontaminação da matriz antes das análises, detecção dos produtos de biotransformação, além dos compostos inalterados, e utilização dos valores de *cut-off* estabelecidos pela *Society of Hair Testing* - SoHT (PRAGST; BALIKOVA, 2006; CURTIS; GREENBERG, 2008; TSANACLIS; WICKS, 2008).

E por fim outro fator importante que deve ser levado em consideração são os procedimentos capilares como tinturas, branqueadores, uso de formol, além de exposição ultravioleta. De um modo geral, a concentração de uma substância declina de 30 a 80% quando se compara o valor observado antes dos tratamentos com aqueles obtidos após, o que poderia gerar um resultado que não condiz com a realidade (HENDERSON, 1993; DE AQUINO NETO; MARQUES; PEREIRA, 2002).

A **Figura 2** ilustra os principais processos que influenciam a incorporação de substâncias no cabelo e os efeitos do elemento crítico tempo.

Figura 2: Fatores de incorporação de substâncias psicoativas no cabelo (Fonte: adaptado de KIDWELL; SMITH, 2007).

2.5 Aspectos analíticos para análises em cabelo

Frente as peculiaridades apresentadas, a análise de substâncias psicoativas em cabelo envolve algumas etapas para garantir resultados confiáveis e válidos, sendo elas: (1) coleta e armazenamento adequados; (2) segmentação do cabelo; (3) descontaminação e corte do cabelo; (4) digestão da matriz com soluções básicas ou incubação com metanol ou soluções tampão; (5) extração ou *clean up* do analito por extração em fase líquida (LLE), extração em fase sólida (SPE), microextração em fase sólida (SPME), por microextração em fase líquida (LPME), etc.; (6) análise do analito por imunoensaio e/ou cromatografia (em fase gasosa ou líquida) acoplada à espectrometria de massas (GC-MS ou LC-MS) e por último (7) interpretação dos resultados (KRONSTRAND et al., 2004; KINTZ, 2004). Estas etapas estão apresentadas na **figura 3**.

Figura 3: Passos práticos da análise de cabelo (Fonte: adaptado de PRAGST; BALIKOVA, 2006).

2.5.1 Procedimentos pré-analíticos

2.5.1.1 Amostragem e armazenamento

Algumas considerações devem ser seguidas no momento de realizar a amostragem de cabelo. Sendo assim, a coleta deve ser realizada em localização anatômica onde os fios estejam relativamente uniformes e a uma distância também uniforme do couro cabeludo, evitando ao máximo que haja qualquer tipo de contaminação externa (NAKAHARA, 1999; BOUMBA; ZIAVROU; VOUGIOUKLAKIS, 2006). A quantidade coletada deverá ser suficiente para o número de testes a serem realizados (aproximadamente de 100 a 200 mg de cabelo), levando-se em consideração as etapas de triagem e confirmação, além da coleta de prova e contraprova.

Após a coleta, as amostras de cabelo devem ser armazenadas em local seco e à temperatura ambiente, visto que sob estas condições a maior parte dos fármacos ou seus produtos de biotransformação são muito estáveis, podendo ser detectados após anos de armazenamento (BOUMBA; ZIAVROU; VOUGIOUKLAKIS, 2006).

2.5.1.2 Descontaminação

A descontaminação da amostra de cabelo é necessária, pois produtos para cabelos (xampu, sprays, etc.), bem como suor, sebo e poeira, normalmente presentes na matriz, levam a um aumento de ruído analítico, além do fato das substâncias dispersas no ambiente poderem aderir ao cabelo do indivíduo, contribuindo potencialmente para resultados incorretos. Deste modo, o objetivo da lavagem é remover apenas a contaminação externa, sujeira e gordura da superfície do cabelo, enquanto as substâncias psicoativas incorporadas na matriz do cabelo não devem ser removidas nesse processo (NAKAHARA, 1999; BOUMBA; ZIAVROU; VOUGIOUKLAKIS, 2006).

Desta forma, para excluir a possibilidade de um resultado analítico positivo originado a partir de contaminação do meio ambiente, procedimentos de descontaminação por diferentes métodos de lavagem do cabelo devem ser considerados, como (1) lavagem com metanol, etanol, acetona, etc. (KOREN et al., 1992), (2) lavagem com solução de dodecil-sulfato de sódio ou outros detergentes (WELCH et al., 1993), (3) lavagem com diclorometano (GAILLARD; PEPIN, 1997) e (4) procedimentos combinados que utilizam solventes orgânicos e lavagens repetidas com tampão fosfato (CAIRNS et al., 2004). A SoHT recomenda o uso de pelo menos um solvente orgânico inicial, para remover óleos, seguido por lavagens aquosas (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

2.5.1.3 Procedimentos de digestão/extração da matriz

Após a lavagem das amostras, o analito é recuperado do interior do cabelo por meio de procedimentos de extração/digestão. Este procedimento pode ser realizado através da incubação do cabelo em determinadas soluções ou através da digestão da matriz capilar (COOPER, 2011). A literatura apresenta diversos métodos para este processo, porém, por não haver um método de escolha, estes devem ser analisados frente às diferentes características químicas de cada substância, evitando deste modo uma extração pouco eficiente e o comprometimento da sensibilidade do método (PRAGST; BALIKOVA, 2006).

As técnicas de incubação comumente empregam solventes orgânicos, como metanol, com o intuito destes promoverem a expansão da matriz capilar e a liberação

dos analitos através da difusão e dissolução dos compostos neutros e lipofílicos. Esta técnica apresenta como vantagem a boa recuperação dos analitos não causando alterações químicas na substância recuperada (CURTIS; GREENBERG, 2008). Este processo também pode ser realizado com o emprego da mistura de solventes, geralmente aplicado em métodos seguidos de análise por LC-MS, devido a sua semelhança com a fase móvel do sistema (VOGLIARD et al., 2015).

A incubação da matriz com soluções tampão também são citadas pela literatura. Substâncias básicas (p.ex. opiáceos, cocaína e seus produtos de biotransformação, as anfetaminas e benzodiazepínicos) são extraídas eficazmente através da utilização de tampão fosfato (pH 5 ou 8) devido a protonação do átomo de nitrogênio presente nas moléculas e um aumento da sua solubilidade aquosa (VOGLIARD et al., 2015).

Já as técnicas de digestão promovem a destruição da queratina do cabelo, pelo uso de soluções básicas, liberando assim as substâncias incorporadas. A extração alcalina pode resultar em digestão mais completa e conseqüentemente, na maior recuperação da substância de interesse (CURTIS; GREENBERG, 2008), sendo este, o processo de escolha para compostos mais estáveis como anfetaminas e canabinoides (BOUMBA; ZIAVROU; VOUGIOUKLAKIS, 2006). Para compostos como a cocaína e heroína, outros métodos devem ser escolhidos visto que estas substâncias sofrem processo de hidrólise nestas condições (VOGLIARD et al., 2015).

Ambos os processos de digestão/extração têm como característica a produção de um elevado nível de impurezas em seu extrato. Portanto, um procedimento secundário envolvendo outras técnicas de extração como LLE, SPE, SPME ou LPME é geralmente recomendado (PRAGST; BALIKOVA, 2006; OLIVEIRA et al., 2007a).

2.5.1.4 Procedimentos de *clean up*

Os procedimentos de *clean-up* aplicados para amostras de cabelo tem o mesmo objetivo quando aplicados às outras matrizes – reduzir a presença de possíveis interferências da matriz e concentrar os analitos alvo. Em geral, as técnicas de preparação de amostras mais comumente aplicadas incluem as tradicionais LLE e a SPE, entretanto métodos de preparo de amostras envolvendo técnicas miniaturizadas são a tendência atual. Entre elas podemos citar a SPME por headspace, extração dinâmica em fase sólida (SPDE), extração de fluidos supercríticos, LPME, etc. (BACIU et al., 2015).

A extração em fase sólida foi introduzida em 1976 e, hoje, consiste no método mais popular de preparo de amostra devido principalmente à sua alta porcentagem de recuperação do analito. É uma técnica de separação que se tornou bastante empregada para matrizes complexas utilizando os mesmos materiais adsorventes aplicados para a cromatografia. Este material adsorvente, chamado de sorvente retém seletivamente os analitos de interesse presentes na amostra e estes são retirados posteriormente com o uso de solvente apropriado. O solvente empregado no condicionamento dependerá do sorvente a ser ativado e da matriz a ser processada, optando-se por aquele com características similares ao solvente presente na amostra (JARDIM, 2010; CALDAS, 2011).

Em geral, os procedimentos da SPE contêm quatro etapas: 1) condicionamento/ativação do sorvente com solvente orgânico; 2) introdução da amostra e sorção dos analitos; 3) limpeza da coluna para retirar os interferentes e por último 4) Eluição do analito. A **figura 4** apresenta esquematicamente estas etapas.

Figura 4: Representação esquemática das etapas da SPE.

Já a técnica de LPME foi introduzida pela primeira vez em 1996, pertencendo ao grupo das “*green techniques*” que tem por objetivo a menor manipulação da amostra e a diminuição do volume de solventes orgânicos. Na LPME uma pequena fibra porosa oca é mantida em contato direto com a amostra liquefeita. Os poros da fibra são preenchidos com solvente orgânico imiscível em água enquanto no interior da fibra é

colocado o líquido aceptor. Se a fase aceptor é uma solução ácida ou básica, o sistema é denominado trifásico. A **figura 5** traz uma representação esquemática do sistema (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008; MERIB; CARASEK, 2013).

Figura 5: Esquema da LPME no sistema trifásico (Fonte: ROVERI; PARANHOS; YONAMINE, 2015).

Nesse sistema trifásico, os analitos na sua forma molecular são capazes de atravessar a camada orgânica dos poros da fibra e entrar em contato com o líquido aceptor que irá ionizar as moléculas. Assim, o líquido aceptor funcionará como armadilha, aprisionando e concentrando os analitos. Esse sistema geralmente é mantido sob agitação mecânica ou submetido em ultrassom para aumentar a velocidade de transferência dos analitos para a fase extratora (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2008). A principal desvantagem da técnica é a falta de automatização do processo.

Alguns exemplos encontrados na literatura sobre os principais métodos de digestão, extração e *clean up* das substâncias psicoativas de interesse em amostras de cabelo são apresentados na **tabela 3**.

Tabela 3: Alguns trabalhos já publicados sobre detecção de substâncias psicoativas em amostras de cabelo.

Continua

REFERÊNCIA	CLASSE DE SUBSTÂNCIAS	EXTRAÇÃO DA MATRIZ	CLEAN UP	DERIVAT.	DETECÇÃO
GAILLARD; PEPIN, 1997	Barbitúricos	Água por 12h à 56°C	SPE	-	GC-MS
SAISHO; TANAKA; NAKAHARA, 2001	Fenobarbital e Fenitoína	Metanol: acetona: NH ₄ OH <i>overnight</i> à temp. ambiente	SPE	TMAH	GC-MS
SKENDER et al., 2002	Anfetaminas, Opiáceos e Cocaína	Metanol por 18h à 40°C	SPE	HFBA	GC-MS
MONTAGNA et al., 2002	Opiáceos e Cocaína	HCl 0,1 mol/L <i>overnight</i> à 45°C	SPE	MSTFA	GC-MS
ROMOLO et al., 2003	Opiáceos e Cocaína	Tampão fosfato pH 5 - 0,1N por 18h à 45°C	SPE	MSTFA + 1%TCMS	GC-MS
FRISON et al., 2003	Barbitúricos	NaHCO ₃ 0,1 mol/L - <i>overnight</i> à 30°C	SPME	-	GC-MS/MS
TOLEDO et al., 2003	Cocaína	Metanol por 18h à 50°C	SPME	Piridina + Butilcloroformato	GC-MS

Continuação

REFERÊNCIA	CLASSE DE SUBSTÂNCIAS	EXTRAÇÃO DA MATRIZ	CLEAN UP	DERIVAT.	DETECÇÃO
VILLAMOR et al. 2005	Anfetaminas	NaOH 1 mol/L por 1h à 40°C	LLE	PFPA	GC-MS
MILLER; WYLIE; OLIVER, 2006	Benzodiazepínicos	Tampão Fosfato por 1h à 60°C (ELISA). Metanol: 25% NH ₄ OH <i>overnight</i> (LC-MS/MS)	SPE	-	ELISA e LC-MS/MS
HAN et al., 2006	Anfetaminas	Tampão Fosfato por 1h à 60°C (ELISA). Metanol + HCl 1% por 20 h (GC-MS)	2006	ATFA	GC-MS
OLIVEIRA; YONAMINE; MOREAU, 2007b	Canabinoides	NaOH 1mol/L por 20 min à 90°C	SPME	-	GC-MS
KIM; IN, 2007	Canabinoides	NaOH 1 mol/L por 30 min à 95°C	LLE	PFPOH e PFPA	GC-MS/MS
CHEZE et al., 2007	Anfetaminas	NaOH 1 mol/L por 15 min à 80°C	LLE	-	LC-MS/MS
PUJOL et al., 2007	Canabinoides, Anfetaminas, Opiáceos e Cocaína	Metanol por 16h à 40°C	LLE	HFBA e BSTFA + 1%TCMS	ELISA e GC-MS

Continuação

REFERÊNCIA	CLASSE DE SUBSTÂNCIAS	EXTRAÇÃO DA MATRIZ	CLEAN UP	DERIVAT.	DETECÇÃO
CORDEIRO; PATERSON, 2007	Anfetaminas, Opiáceos, Cocaína e Benzodiazepínicos	HCl 0,1 mol/L por 16h à 50°C	SPE	MBTFA e MSTFA + 1%TMCS	GC-MS
MILLER; WYLIE; OLIVER, 2008	Benzodiazepínicos, Opiáceos e Cocaína	Tampão fosfato pH 5 - 0,1N por 18h à 45°C	SPE	-	LC-MS/MS
TSANACLIS; WICKS, 2008	Anfetaminas, Benzodiazepínicos, Cocaína, Opiáceos e Canabinoides	Incubação com Metanol e Digestão por NaOH	LLE e SPE	ATFA e BSTFA + 1%TCMS	GC-MS/MS
AUWARTER et al., 2010	Canabinoides	NaOH 1 mol/L por 10 min à 95°C	LLE	MSTFA	GC-MS
LENDIRO et al., 2012	Anfetaminas, Benzodiazepínicos, Cocaína, Opiáceos e Canabinoides	Acetonitrila por 12h à 50°C	LLE seguida de SPE	-	LC-MS/MS
PANTALEÃO; PARANHOS; YONAMINE, 2012	Anfetaminas	NaOH 1 mol/L por 15 min à 70°C	LPME	ATFA	GC-MS/MS

Conclusão

REFERÊNCIA	CLASSE DE SUBSTÂNCIAS	EXTRAÇÃO DA MATRIZ	CLEAN UP	DERIVAT.	DETECÇÃO
MAUBLANC et al., 2014	Benzodiazepínicos	Tampão fosfato pH 5 por 16h	LLE	-	LC-MS/MS
NIELSEN; JOHANSEN; LINNET, 2014	Anfetaminas, Benzodiazepínicos, Cocaína e Opiáceos	Metanol: acetonitrila: 2 milimol/L formato de amônio - pH 5,3 por 18h à 37 °C	-	-	UPLC - MS/MS
MONTESANO; JOHANSEN; NIELSEN, 2014	Anfetaminas, Benzodiazepínicos, Cocaína, Opiáceos e Barbitúricos	Metanol: acetonitrila: 2 milimol/L formato de amônio - pH 5,3 por 18h	-	-	UPLC-MS/MS
SHAH et al., 2014	Anfetaminas, Cocaína, Opiáceos e Canabinoides	NaOH 1 mol/L por 5 min à 95 °C	LLE	-	LC-MS/MS
IMBERT et al., 2014	Anfetaminas, Cocaína e Opiáceos	Tampão fosfato pH 5 - 0,1N por 18h à 45°C	SPE	-	LC-MS/MS
AGIUS; NADULSKI, 2014	Anfetaminas, Benzodiazepínicos, Cocaína, Opiáceos e Canabinoides	Tampão fosfato pH 6,0 por 5h	-	-	ELISA

Legenda: GC – cromatografia gasosa; LC – cromatografia líquida; UPLC - cromatografia líquida de ultra performance; MS – espectrometria de massas; NaOH – hidróxido de sódio; NH₄OH – hidróxido de amônio; NaHCO₃ – bicarbonato de sódio; HCl – ácido clorídrico; BSTFA - N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida; TCMS – trimetilclorosilano; HFBA – ácido heptafluorobutírico; MBTFA – N-metil-bis-trifluoroacetamida; TMAH – hidróxido tetrametilamônico; MSTFA - N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida; PFPA anidrido pentafluoropropionico; PFPOH - pentafluoropropanol e ATFA – anidrido trifluoracético.

2.5.2 Procedimentos analíticos

As técnicas utilizadas para a detecção de substâncias psicoativas em amostras de cabelo são as mesmas utilizadas para a detecção dessas substâncias em urina, sangue e outros fluidos biológicos, sendo estas imunológicas ou cromatográficas (associados ou não à espectrometria de massas). Entretanto, a análise em cabelo necessita de métodos de preparo de amostras específicos para ser compatível com as técnicas mencionadas.

2.5.2.1 Técnicas imunológicas

Os primeiros imunoensaios foram publicados no final da década de 50 e desde então tornaram-se uma técnica amplamente utilizada rotineiramente em diversos campos, incluindo a toxicologia (NIEDBALA; GONZALEZ, 2011).

Por definição geral esta técnica utiliza o reconhecimento molecular específico das interações de ligação entre anticorpo-antígeno para detectar e quantificar substâncias que estão presentes em quantidades mínimas em matrizes biológicas. (TSAI, 2005).

Embora se apresentem de diversas formas no mercado, todos os ensaios imunológicos contêm elementos chave em comum. O primeiro deles é a presença de um anticorpo marcado para um antígeno (analito) específico. O anticorpo deve ser específico para sua molécula alvo, inespecífico para os outros constituintes da matriz e estável durante o período de armazenamento do *kit*. O segundo elemento são as soluções tampão empregadas para o preparo das amostras. Estas soluções permitem que as amostras fiquem compatíveis tanto com o anticorpo quanto para o formato de ensaio a ser utilizado. O terceiro é o “sinalizador” de resposta, elemento utilizado para

determinar os resultados dos imunoensaios, podendo estes serem radioativos, enzimáticos, quimioluminescentes, etc. (NIEDBALA; GONZALEZ, 2011).

As substâncias psicoativas são consideradas de baixo peso molecular e para estes compostos são utilizados preferencialmente imunoensaios do tipo competitivo, onde as substâncias de interesse presentes na amostra competem com um antígeno derivado pela ligação com o anticorpo (TSAI, 2005).

Além disso, os imunoensaios competitivos podem ser divididos em homogêneos e heterogêneos. Os ensaios heterogêneos comumente possuem uma placa sólida revestida com anticorpos imobilizados e requerem etapas de lavagem durante seu procedimento a fim de remover tudo aquilo que não está ligado ao anticorpo. Esta etapa pode aumentar o sinal de um analito por diminuir o efeito da matriz das amostras, propiciando assim limites de detecção mais baixos necessários, por exemplo, para os ensaios de triagem para drogas de abuso (TSAI, 2005; NIEDBALA; GONZALEZ, 2011).

Em 1979, Baumgartner et al. (1979), publicaram o primeiro trabalho sobre a utilização de RIA para detecção de morfina em cabelo dando início às análises de substâncias psicoativas neste tipo de matriz. Em sequência, outras substâncias como cocaína e benzoilecgonina (BAUMGARTNER et al., 1982) e fenciclidina (BAUMGARTNER; BLACK; JONES, 1981) foram detectadas por RIA, sendo estes ensaios os pioneiros no mundo. Atualmente são os testes de ELISA que vem ganharam espaço nas análises de cabelo já sendo detectadas substâncias como de opiáceos, cocaína, canabinoides, benzodiazepínicos e metadona (SEGURA et al., 1999; PRAGST; BALIKOVA, 2006; AGIUS; NADULSKI, 2014).

Por apresentar caráter qualitativo ou semi-quantitativo os imunoensaios são utilizados nas análises toxicológicas como técnicas de triagem seguida em caso positivo de uma segunda técnica analítica baseada em uma propriedade diferente como a espectrometria de massas, para fins confirmatórios (CASSANI; SPIEHLER, 1993; COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

Embora a literatura também aponte o emprego de LC-MS/MS nas etapas de triagem, a prevalência muito elevada de resultados negativos faz com que os imunoensaios ainda sejam a técnica de escolha. Além da sua capacidade de identificar as possíveis amostras positivas e eliminar as negativas, as técnicas de imunoensaio são relativamente rápidas e de menor custo quando comparadas as técnicas confirmatórios (SACHS, 2007; COULTER et al., 2010; BAUMGARTNER et al., 2012).

Mesmo as técnicas de imunoensaio para triagem de amostras de cabelo serem a de escolha, estes devem preencher alguns requisitos básicos para este processo, incluindo (1) reatividade cruzada tanto com o fármaco original quanto para seus produtos de biotransformação, (2) ausência de interferentes de matriz - cabelo dissolvido, e (3) valores de *cut-off* apropriados para a concentração encontrado no cabelo (SPIEHLER, 2000; HAN et al., 2006; COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

Os valores de *cut-off* para métodos de imunoensaio são principalmente utilizados para evitar resultados falsos positivos, uma vez que os efeitos da matriz e a reatividade cruzada com outros compostos são fatores relevantes em ensaios com amostras de cabelo (BOUMBA; ZIAVROU; VOUGIOUKLAKIS, 2006). A SoHT, com base nas diretrizes anteriores e na literatura disponível, recomenda valores de *cut-off* conforme a **tabela 4** (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012). Contudo, para barbitúricos e benzodiazepínicos ainda não há valores pré-estabelecidos. A *European Workplace Drug Testing Society* (EWDTS) recomenda para benzodiazepínicos valores de *cut-off* tanto para triagem quanto para confirmação de 0,05 ng/mg de cabelo (AGIUS; KINTZ, 2010).

Tabela 4: Valores de *cut-off* para substâncias e seus produtos de biotransformação em cabelo.

Triagem		Confirmação	
Grupo	Cut-off (ng/mg)	Analito alvo	Cut-off (ng/mg)
Anfetaminas	0,2	Anfetamina	0,2
		Metanfetamina	0,2
		MDA	0,2
		MDMA	0,2
Canabinoides	0,1	THC	0,05
		THCCOOH	0,0002
Cocaína	0,5	Cocaína	0,5
		BZE e CE	0,05
Opiáceos	0,2	Morfina	0,2
		Codeína	0,2

Legenda: MDA - 3,4-metilenodioxianfetamina; MDMA - 3,4-metilenodioxianfetamina; THC - Δ^9 -tetraidrocanabinol; THCCOOH - ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico; BZE – Benzoilecgonina e CE - cocaetileno (Fonte: COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

2.5.2.1.1 *The Evidence Investigator™: Drugs of Abuse I Whole Blood Plus Assays – Randox*

A Randox Laboratórios é uma empresa internacional de diagnósticos clínicos responsável por desenvolver um sistema semi-automatizado para análise de biochips denominado *Evidence Investigator™*. A tecnologia Biochip é uma plataforma para testes de imunoensaio multi-analito com uma vasta gama de painéis disponíveis direcionando tipo de imunoensaio e de analito (RANDOX, 2009).

O Biochip é um substrato sólido contendo regiões marcadas com anticorpos específicos e imobilizados para diferentes classes de substâncias, dependendo do painel escolhido, sendo o de estudo DOA I WB P.

O painel *Drugs of Abuse I Whole Blood Plus Assays* (DOA I WB P) são testes para a determinação semi-quantitativa da molécula original e dos produtos de biotransformação de diversas substâncias no sangue humano, como por exemplo, as anfetaminas, barbitúricos, benzodiazepínicos, cocaína, opiáceos, canabinoides entre outras (RANDOX, 2009).

O princípio do imunoensaio apresentado por este *kit* é do tipo competitivo heterogêneo e a leitura dos resultados é feita por captura de imagem a partir da quimiluminescência gerada na superfície do biochip (RANDOX, 2009). As vantagens da quimiluminescência incluem (1) maior sensibilidade; (2) menor sinal ruído e (3) tempo de análise reduzido (FLANAGAN et al., 2005). A **figura 6** traz uma representação do princípio deste imunoensaio.

Figura 6: Biochip - Imunoensaio competitivo heterogêneo quimioluminescente (Fonte: adaptado de RANDOX, 2009).

De uma maneira geral os imunoensaios competitivos do tipo heterogêneo apresentam etapas muito semelhantes. No imunoensaio utilizado neste trabalho, o procedimento de análise se inicia com a adição de solução tampão na superfície do biochip para ativar os anticorpos fixados. Em seguida é adicionada a amostra e depois o conjugado. O conjugado é um complexo molecular que contém a enzima HRP (*Horseradish peroxidase*) mais derivados multi-analitos (partes da molécula dos analitos de interesse) que tem como objetivo competir com os analitos da amostra pela ligação com anticorpo (RANDOX, 2009).

A reação de competição ocorre durante 30 minutos e após incubação os biochips são lavados diversas vezes para a remoção do excesso de amostra e conjugado (RANDOX, 2009).

Para finalizar o processo é adicionado ao biochip uma mistura de luminol e peróxido de hidrogênio que por oxidação liberam luz visível quando em contato com a enzima HRP. Como o processo de imunoensaio é do tipo competitivo quanto menos analito conter na amostra mais o conjugado irá se ligar aos anticorpos do biochip gerando mais quimioluminescência (RANDOX, 2009).

A leitura deste sinal é feita através de uma câmera no interior do analisador *Evidence Investigator* responsável pela captura imagens do biochip. As imagens quimioluminescentes são convertidas pelo software e comparadas com a curva de calibração para obtenção de um resultado (RANDOX, 2009).

As imagens emitidas só são capturadas com sucesso pelo analisador se as regiões de teste do biochip estiverem com sua orientação correta para leitura. Cada biochip possui 25 *Discrete Test Regions* – DTR aonde estão injetados os anticorpos para cada droga, além das regiões para controle interno, correção e referência necessárias para o alinhamento do equipamento (RANDOX, 2009). A **figura 7** apresenta a disposição geométrica das regiões de teste no biochip.

Legenda: REF - ponto de referência; COR - ponto de correção; BENZ 1 e 2 - benzodiazepínicos 1 e 2; BARB - barbitúricos; MAMP - metanfetamina; BZG - benzoilecgonina; PCP - fenciclidina; OPIAT - opiáceos; MDONE - metadona; BUP: buprenorfina; AMPH – anfetamina; TCA – antidepressivos tricíclicos.

Figura 7: Representação geométrica da disposição das regiões de teste - DTR no biochip (Fonte: adaptado de RANDOX, 2009).

A partir desta tecnologia foi avaliado a aplicação do método de triagem para as classes das anfetaminas, opiáceos, benzodiazepínicos, barbitúricos, cocaína e THC em cabelo a partir da adaptação do *kit* para imunoensaio em sangue DOA I WB P com a tecnologia Biochip - Randox Laboratórios® visto que a adaptação do *kit* de imunoensaio é promissora por compreender alguns dos requisitos básicos para métodos de triagem estabelecidos pela SoHT, incluindo, reatividade cruzada com o fármaco inalterado e seus produtos de biotransformação e a capacidade de detectar valores de *cut-off* já pré estabelecidos.

3 OBJETIVOS

Os objetivos do projeto foram o desenvolvimento e a avaliação do desempenho do método para imunoensaio para determinação de anfetaminas, benzodiazepínicos, barbitúricos, opiáceos, cocaína e canabinoides a partir da adaptação de *kit* para imunoensaio DOA I WB P em sangue com a tecnologia Biochip - Randox Laboratórios®, utilizando uma única amostra de cabelo.

4 PLANO DE TRABALHO/ DELINEAMENTO DO ESTUDO

Para se alcançar o objetivo do trabalho proposto as seguintes etapas foram seguidas:

- Coleta de amostras reais;
- Validação dos métodos analíticos para fins confirmatórios;
- Produção de amostras de cabelo artificiais;
- Quantificação das amostras artificiais pelos métodos confirmatórios;
- Avaliação dos procedimentos de extração através da técnica de imunoensaio;
- Avaliação da aplicabilidade do método de imunoensaio proposto.

5 MATERIAL E MÉTODOS - Geral

5.1 Equipamentos e Programas

- Equipamento de imunoensaio *Evidence Investigator - Randox Toxicology*;
- Equipamento de cromatografia em fase gasosa acoplado à espectrometria de massas (GC-MS) com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 metros, 0,25 µm de diâmetro e 0,1 µm de filme) e sistema quadrupolo - *Agilent Technologies* (Califórnia, EUA);
- Equipamento de cromatografia em fase gasosa acoplado à espectrometria de massas (GC-MS) com coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 metros, 0,25 µm de diâmetro e 0,1 µm de filme) e sistema *Ion Trap - Thermo Fisher Scientific* (Bremen, Alemanha);
- Programa *Microsoft Excel®* 2013 para apresentação dos resultados através da exportação dos dados brutos;
- Programa *Graphpad Prism 6®* 2012 para representação gráfica dos dados brutos obtidos no imunoensaio.

5.2 Reagentes e outros materiais

- Reagentes para o teste de imunoensaio - *Randox Toxicology* (Irlanda);
- Solventes e sais - *Merck* (Alemanha) e *Sigma Aldrich* (EUA).
- Fibras de LPME Q3/2 Accurel KM de polipropileno (600µm i.d., 200 µm espessura da parede e 0.2 µm de tamanho de poros) - *Membrana®* (Wuppertal, Alemanha).
- Cartuchos de extração em fase mista, *Bond Elut Certify* 130 mg/3mL – *Agilent Technologies*.

5.3 Padrões

- Soluções-padrão de anfetaminas (anfetamina, metanfetamina, MDMA e MDA), e seus deuterados (anfetamina-d5 e MDMA-d5), opiáceos (morfina e codeína) e

seus deuterados (morfina-d3 e codeína-d3), benzodiazepínicos (diazepam, nordiazepam e oxapezam) e seu deuterado (diazepam-d5), barbitúricos (fenobarbital, secobarbital e pentobarbital) e seus deuterados (fenobarbital-d5, secobarbital-d5 e pentobarbital-d5), cocaína, benzoilecgonina, cocaetileno, anidroecgonina metil ester – AEME e seus deuterados cocaína-d3, benzoilecgonina-d3 e cocaetileno-d3 foram adquiridos nas concentrações de 100 µg/mL e 1,0 mg/mL da *Cerilliant Corporation* (Round Rock, Texas, EUA). Os padrões deuterados foram utilizados como padrão interno. A partir destas soluções foram preparadas as soluções de trabalho.

5.4 Coleta e armazenamento das amostras

As amostras de cabelo de referência negativa foram obtidas de voluntários que não fizeram uso de nenhuma das substâncias em estudo. Com estas amostras foram realizados dos testes de otimização e desenvolvimento dos métodos

As amostras de cabelo potencialmente positivas foram coletadas de voluntários com suspeita de uso das substâncias psicoativas em estudo proveniente de pacientes internos no Centro para Tratamento para Dependência Química Vila Serena. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Parecer CEP/FCF/978.855 – Anexo A).

A coleta das amostras foi realizada após o preenchimento do questionário (Anexo B) e ciência e concordância na participação do estudo através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Seguindo consenso da SoHT, as amostras de cabelo foram coletadas na nuca, na região logo acima do pescoço, o mais próximo possível do couro cabeludo. Após a coleta as amostras foram armazenadas em papel alumínio, dentro de envelopes de papel e identificadas por números (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

5.5 Preparo das amostras

As amostras de cabelo foram segmentadas de acordo com o período de exposição descrito pelos voluntários e descontaminadas com o objetivo remover qualquer tipo de contaminação externa, sujeira e gordura da superfície do cabelo, sem danificá-lo.

O processo de descontaminação ocorreu em duas etapas, primeiro as amostras foram lavadas com água e detergente neutro e depois de completamente enxaguadas foram adicionados 1 mL de diclorometano para cada 25 mg de cabelo e estes foram incubados por 15 minutos à 37°C (TOLEDO et al., 2003; COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012). Para finalizar as amostras foram evaporadas e cortadas em pequenos pedaços.

5.6 Preparo de cabelo artificial

O preparo do cabelo artificial se fez necessário para avaliar e comparar a eficiência dos procedimentos de digestão/extração citados na literatura no método de imunoensaio.

Desta forma, o cabelo artificial foi quimicamente modificado a partir do procedimento do descrito pelo *National Institute of Standards and Technology* (NIST) com pequenas adaptações (WELCH; SNIEGOSKI; TAI, 2003).

Inicialmente, foram adicionados os padrões analíticos, em quantidades de acordo com a **tabela 5**, em 20 mL de dimetilsulfóxido – DMSO e este sistema foi sonificado por 2 minutos em tubos *falcon* de 50 mL.

Tabela 5: Quantidade de padrão analítico adicionado em 1 grama de cabelo, para cada alíquota.

Analito	Quantidade em µg/g
Anfetamina	15µg
Metanfetamina	20 µg
MDMA	30 µg
Fenobarbital	100 µg
Diazepam	1000 µg
Cocaína	45 µg
Morfina	120 µg

Em seguida os tubos *falcon* foram colocados em banho de gelo e adicionado de mais 20 mL de água deionizada a fim de evitar aquecimento excessivo da mistura. O cabelo livre de drogas foi então adicionado (1 g) e esta mistura foi mantida ao abrigo da luz por aproximadamente 12 dias.

Ao final, o cabelo foi lavado várias vezes com metanol, até sua água de lavagem não apresentar nenhum sinal, evidenciando que os resultados obtidos foram referentes à extração efetiva das substâncias de interesse.

6 MÉTODOS

6.1 Confirmação de anfetaminas por GC-MS

O método de escolha para confirmação das anfetaminas em cabelo por GC-MS foi o desenvolvido por Pantaleão, Paranhos e Yonamine (2012). Este compreende digestão alcalina das amostras seguida de *clean up* pela técnica de LPME.

6.1.1 Método de extração

Após a descontaminação das amostras estas foram separadas em alíquotas de 50 mg e transferidas para tubos de centrífuga. Em seguida foram adicionadas 100 ng dos padrões internos e 1 mL de NaOH 1 mol/L para possibilitar a digestão da fibra capilar e liberação dos analitos da matriz. Os tubos foram fechados e as amostras foram aquecidas em banho de água quente à 70°C por aproximadamente 15 minutos.

Após o resfriamento das amostras a solução é transferida dos tubos de centrífuga para tubos *ependorf* com capacidade de 2 mL contendo 10 mg de NaCl. Para cada amostra utilizou-se uma fibra de microextração de 9 cm impregnada com éter diexílico (fase estacionária) e preenchida com HCl 0,1 mol/L (fase aceptora). O sistema foi agitado em temperatura ambiente durante 45 minutos à 1000 rpm.

Após a agitação a fase aceptora foi retirada do interior da fibra e transferida para um *vial* onde foi evaporada até secura sob fluxo de N₂. Os resíduos foram reconstituídos com 50 µL de TFAA e 50 µL de acetato de etila e derivatizados por 30 minutos à 70°C. O produto obtido foi novamente evaporado até secura a 40°C sob fluxo de N₂ e ressuspendido com 50 µL de acetato de etila. Terminado esse procedimento, 2 µL de cada extrato são injetado automaticamente no GC-MS.

6.1.2 Condições cromatográficas

- Modo de injeção: *splitless*;
- Gás de arraste: hélio a um fluxo constante de 0,6 mL/min;
- Temperatura do injetor: 270°C;
- Temperatura da linha de transferência: 250°C;

- Temperatura do detector: 280°C;
- Programação da temperatura do forno: 70°C (2 min), 10°C/min até 190°C (1 min) e 20°C/min até 270°C (1min). Tempo total de corrida: 21 minutos.

6.1.3 Condições do espectrômetro de massas

- Modo de ionização: ionização por elétrons (EI);
- Modo de operação: *full scan*, com seleção de massas de 50 a 300;
- Temperatura da fonte de ionização: 220°C;
- Íons utilizados para identificação dos analitos (os íons quantificadores estão em **negrito**):

Anfetamina: **118**, 91 e 140;

Anfetamina-d5: **123**, 92 e 144;

Metanfetamina: **154**, 110 e 118;

MDMA: **162**, 110 e 154;

MDMA-d5: **164**, 113 e 158;

MDA: **135**, 162 e 275.

6.2 Confirmação de barbitúricos por GC-MS

O método desenvolvido para confirmação de barbitúricos em cabelo por GC-MS compreende digestão alcalina das amostras seguida de *clean up* pela técnica de LPME (ROVERI; PARANHOS; YONAMINE, 2016).

6.2.1 Método de extração

Após a descontaminação das amostras estas foram separadas em alíquotas de 50 mg e transferidas para tubos de centrífuga. Em seguida foram adicionadas 100 ng dos padrões internos e 1 mL de NaOH 1 mol/L para possibilitar a digestão da fibra capilar e liberação dos analitos da matriz. Os tubos foram fechados e as amostras foram aquecidas em banho de água quente à 70°C por aproximadamente 15 minutos.

Após o resfriamento das amostras estas foram acidificadas com HCl (pH<3) agitadas e transferidas para tubos *ependorf* com capacidade de 2 mL. Para cada amostra utilizou-se uma fibra de microextração de 9 cm impregnada com decanol (fase

estacionária) e preenchida com NaOH 0,1 mol/L (fase aceptora). O sistema foi agitado em banho de ultrassom por 10 minutos.

Após a agitação a fase aceptora foi retirada do interior da fibra e transferida para um *vial* onde foi evaporada até secar à 40°C sob corrente de N₂. Os resíduos foram reconstituídos com 10 µL de TMAH e 40 µL de acetato de etila sendo injetados 2 µL de cada extrato em sistema GC-MS.

6.2.2 Condições cromatográficas

- Modo de injeção: *splitless*;
- Gás de arraste: hélio a um fluxo constante de 0,6 mL/min;
- Temperatura do injetor: 250°C;
- Temperatura da linha de transferência: 280°C;
- Temperatura do detector: 280°C;
- Programação da temperatura do forno: 90°C (1 min), 32°C/min até 170°C (2 min) e 20°C/min até 270°C (1,5 min). Tempo total de corrida: 12 minutos.

6.2.3 Condições do espectrômetro de massas

- Modo de ionização: ionização por elétrons (EI);
- Modo de operação: *full scan*, com seleção de massas de 50 a 250;
- Temperatura da fonte de ionização: 220°C;
- Íons utilizados para identificação dos analitos (os íons quantificadores estão em **negrito**):

Fenobarbital: **232**, 117 e 175;

Fenobarbital-d5: **237**, 122 e 180;

Secobarbital: **196**, 131 e 181;

Secobarbital-d5: **201**, 116 e 183;

Pentobarbital: **169**, 184 e 225;

Pentobarbital-d5: **171**, 114 e 189.

6.3 Confirmação de benzodiazepínicos por GC-MS

O método de escolha para confirmação dos benzodiazepínicos em cabelo por GC-MS foi o desenvolvido pela aluna de então mestrado Lorena Pantaleão. Este compreende incubação das amostras com a mistura de metanol, acetonitrila e NH_4OH seguida de *clean up* pela técnica de SPE (PANTALEÃO, 2012).

6.3.1 Método de extração

Após a descontaminação das amostras, estas foram separadas em alíquotas de 50 mg e transferidas para tubos de centrífuga. Em seguida foram adicionadas 100 ng dos padrões internos e 2 mL de uma mistura de metanol:acetonitrila: NH_4OH (10:10:1). Em seguida foi realizada a incubação dessas amostras a 40°C por 7 horas. Após extração da matriz e resfriamento, as amostras foram aplicadas a cartuchos de extração em fase sólida em fase mista (Bond Elut Certify®), previamente condicionados pela adição sequencial de 2 mL de metanol e 2 mL de solução tampão fosfato pH 6,0 0,1 mol/L. Terminada a passagem das amostras pelos cartuchos, a etapa de lavagem foi realizada pela adição de 2 mL de água deionizada, 1 mL de HCl 0,1 mol/L, e então os cartuchos foram secos sob vácuo por 15 minutos. A etapa de lavagem foi concluída pela passagem de 1 mL de metanol. Os analitos foram eluídos com 2 mL de solução de diclorometano:isopropanol: NH_4OH (80:20:3). Os extratos então foram evaporados sob fluxo de nitrogênio à 40°C. Os resíduos resultantes foram reconstituídos com 50 µL de MTBSTFA com 1% de TBDMS e derivatizados por 45 minutos a 90°C. Finalizado o procedimento 2 µL foram injetados de cada extrato em sistema GC-MS.

6.3.2 Condições cromatográficas

- Modo de injeção: *splitless*;
- Gás de arraste: hélio a um fluxo constante de 0,9 mL/min;
- Temperatura do injetor: 260°C;
- Temperatura do detector: 280°C;
- Programação da temperatura do forno: 150°C (1 min), 30°C/min até 220°C (1 min); 20°C/min até 300°C (5 min). Tempo total de corrida: 14 minutos.

6.3.3 Condições do espectrômetro de massas

- Modo de ionização: ionização por elétrons (EI);
- Modo de operação: *SIM (selected ion monitoring)*;
- Temperatura da fonte de ionização: 220°C;
- Íons utilizados para identificação dos analitos (os íons quantificadores estão em **negrito**):

Diazepam: **256**, 283 e 284;

Diazepam-d5: **261**, 288, 289;

Nordiazepam: **327**, 328 e 329;

Oxazepam: **457**, 513 e 514.

6.4 Confirmação de cocaína e seus produtos de biotransformação por GC-MS

O método desenvolvido em parceria com a doutoranda Ana Miguel Pego Fonseca para confirmação de cocaína, AEME, cocaetileno e benzoilecgonina em cabelo por GC-MS foi baseado no método de Toledo et al. (2003) com adaptações. Este compreende incubação das amostras em metanol e *clean up* pela técnica de LPME.

6.4.1 Método de extração

Após a descontaminação das amostras estas foram separadas em alíquotas de 50 mg e transferidas para tubos de centrífuga. Em seguida foram adicionadas 100 ng dos padrões internos e 2 mL de metanol para extração dos analitos da matriz. Os tubos foram fechados e as amostras foram incubadas por 18 horas à 50°C. Após resfriamento, as amostras foram transferidas para *vials* de 4 mL e evaporadas sob fluxo de nitrogênio à 50°C (TOLEDO et al., 2003; PUJOL et al., 2007; DI CORCIA et al., 2012; FERNÁNDEZ et al., 2014).

O resíduo obtido foi então derivatizado com 100 µL de acetonitrila, 2 µL de piridina e 2 µL de butilclorofornato sob banho de ultrassom por 6 minutos. Após a derivatização as amostras tiveram seu pH ajustado entre 9-10 com a adição de 1,5 mL

de água destilada e 30 mg de tampão sólido ($\text{NaHCO}_3:\text{K}_2\text{CO}_3 - 2:1$) (TOLEDO et al., 2003).

As amostras então foram transferidas para *ependorfs* com capacidade de 2 mL e submetidas a técnica de LPME. Em cada amostra foi emergida uma fibra de microextração de 9 cm impregnada com éter diexílico (fase orgânica) e preenchida com HCl 0,05M mol/L (fase aceptora). Este sistema foi agitado à 2400 rpm por 15 minutos. Os extratos obtidos foram evaporados sob fluxo de nitrogênio à 40°C, reconstituídos com 50 µL de acetato de etila e injetados 1 µL em sistema automático GC-MS.

6.4.2 Condições cromatográficas

- Modo de injeção: *splitless*;
- Gás de arraste: hélio a um fluxo constante de 1,0 mL/min;
- Temperatura do injetor: 250°C;
- Temperatura do detector: 280°C;
- Programação da temperatura do forno: 90°C (1 min), 15°C/min até 250°C (2 min), 25°C/min até 280°C (2min). Tempo total de corrida: aproximadamente 17 minutos.

6.4.3 Condições do espectrômetro de massas

- Modo de ionização: ionização por elétrons (EI);
- Modo de operação: *SIM (selected ion monitoring)*;
- Temperatura da fonte de ionização: 220°C;
- Íons utilizados para identificação dos analitos (os íons quantificadores estão em **negrito**):

AEME: **152**, 166 e 181.

Cocaína: **182**, 272 e 303;

Cocaína-d3: **185** e 306;

Cocaetileno: **196**, 272 e 317;

Cocaetileno-d3: **199** e 320;

Benzoilecgonina: **224**, 272 e 345;

Benzoilecgonina-d3: **227** e 348.

6.5 Confirmação de opiáceos por GC-MS

O método aplicado para confirmação de opiáceos em cabelo por GC-MS foi baseado nos métodos de Romolo et al. (2003), Miller, Wylie e Oliver (2008) e Imbert et al. (2014). Este compreende incubação das amostras com solução tampão e *clean up* pela técnica de SPE.

6.5.1 Método de extração

Após a descontaminação das amostras estas foram separadas em alíquotas de 50 mg e transferidas para tubos de centrífuga. Em seguida foram adicionadas 100 ng dos padrões internos e 3 mL de tampão fosfato pH 5,0 0,1 mol/L para a extração dos analitos da matriz. Os tubos foram fechados e as amostras foram incubadas por 18 horas à 45°C. Após resfriamento as amostras tiveram seu pH foi ajustado para uma faixa de 6-7 com solução de hidróxido de potássio - KOH (IMBERT et al., 2014; ROMOLO et al., 2003; MILLER; WYLIE; OLIVER, 2008).

As amostras então foram submetidas a SPE utilizando-se cartuchos de extração em fase sólida em fase mista (Bond Elut Certify®). Para o condicionamento dos cartuchos foram adicionados 2 mL de metanol e 2 mL de solução tampão fosfato pH 6,0 0,1 mol/L. Após condicionamento as amostras foram inseridas sob um fluxo de no máximo uma gota por segundo. Para a lavagem foram adicionados 2 mL de água destilada, 3 mL de HCl 0,1 mol/L, e então os cartuchos foram secos sob vácuo por 10 minutos. A etapa de lavagem foi concluída pela adição de 2 mL de metanol. Os analitos então foram eluídos com 3 mL de solução recém preparada de diclorometano/isopropanol/NH₄OH (12:3:0,3) (MILLER; WYLIE; OLIVER, 2008; CORDEIRO; PATERSON, 2007; IMBERT et al., 2014; ROMOLO et al., 2003).

Os extratos foram evaporados sob fluxo de nitrogênio à 40°C e reconstituídos com 25 µL de acetato de etila e 25 µL BSTFA com 1% de TCMS e derivatizados por 15 minutos à 90°C. Terminado esse procedimento, 2 µL de cada extrato foram injetados automaticamente em sistema GC-MS.

6.5.2 Condições cromatográficas

- Modo de injeção: *splitless*;

- Gás de arraste: Hélio a um fluxo constante de 0,6 mL/min;
- Temperatura do injetor: 270°C;
- Temperatura do detector: 280°C;
- Programação da temperatura do forno: 150°C (1 min), 10°C/min até 270°C (2 min). Tempo total de corrida: aproximadamente 15 minutos.

6.5.3 Condições do espectrômetro de massas

- Modo de ionização: ionização por elétrons (EI);
- Modo de operação: *SIM (selected ion monitoring)*;
- Temperatura da fonte de ionização: 220°C;
- Íons utilizados para identificação dos analitos (os íons quantificadores estão em negrito):

Morfina: **429**, 414 e 401;

Morfina-d3: **432**, 417 e 404;

Codeína: 178, 196, **371**, 234 e 343;

Codeína-d3: 181, 199, **374**, 237 e 346.

6.6 Validação de métodos

Os métodos de confirmação para anfetaminas e benzodiazepínicos já foram previamente validados no laboratório. Já os demais métodos foram validados de acordo com os parâmetros preconizados pelos guias internacionais de validação - *Scientific Working Group for Forensic Toxicology* (SWGTOX, 2013) e *United Nations Office on Drugs and Crime* (UNODC, 2009) sendo estes: seletividade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, precisão intra e inter dia, exatidão, *carryover* e integridade de diluição (quando aplicável).

Seletividade

A seletividade foi avaliada a partir da análise de seis amostras “zero” e duas amostras “branco” (amostras zero com padrão interno). A presença/ausência de picos interferentes (substâncias endógenas) próximos ao tempo de retenção dos analitos foi avaliada.

Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Para avaliar o LOD, três diferentes amostras brancas de cabelo foram analisadas em duplicata ao longo de três corridas. A média e o desvio padrão de todas as amostras negativas foram calculadas. Da mesma forma, amostras fortificadas com concentrações decrescentes foram avaliadas. A menor concentração de uma amostra fortificada capaz de produzir um sinal maior do que o sinal médio das amostras negativas (X) mais 3,3 vezes o desvio padrão foi identificado como o LOD ($\text{LOD} = X + 3.3s$)

No caso do LOQ, três amostras foram analisadas ao longo de três corridas para demonstrar que todos os critérios para detecção, identificação, precisão e exatidão foram alcançados (coeficiente de variação - $\text{CV}\% < 15\%$). O LOD e o LOQ obtiveram tempo de retenção com variação de no máximo $\pm 2\%$ e espectros de massa com a mesma aparência e proporção entre os íons.

Linearidade

A linearidade foi determinada pela análise de amostras extraídas adicionadas com os padrões analíticos de interesse, em quintuplicata. O coeficiente de determinação - r^2 foi $> 0,99$. As amostras de cabelo foram adicionadas para cada analito nas concentrações que seguem:

- Morfina e codeína: 0,2; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; e 10 ng/mg;
- Cocaína e AEME: 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 ng/mg;
- Cocaetileno e benzoilecgonina: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0 ng/mg e 0,05; 1,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 ng/mg (GAMBELUNGHE et al., 2015).
- Fenobarbital, pentobarbital e secobarbital: 0,25; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10 ng/mg.

O fenômeno de heterocedasticidade foi avaliado aplicando-se o *F-test* (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCAO, 2002).

Carryover

O ensaio de *carryover* foi avaliado pela análise de três amostras branco injetadas no sistema GC-MS imediatamente após a injeção de uma amostra de alta concentração.

Precisão e Exatidão

A precisão e exatidão foram realizadas a partir da análise de amostras de cabelo em três níveis de controle - baixo (CB), médio (CM) e alto (CA), como na **Tabela 6**:

Tabela 6. Níveis de controles para ensaios de precisão e exatidão.

Analitos	CB ng/mg	CM ng/mg	CA ng/mg
Fenobarbital	0,75	4	8
Pentobarbital	0,75	4	8
Secobarbital	0,75	4	8
Cocaína	1,5	9	18
AEME	1,5	9	18
Cocaetileno	0,2	9	18
Benzoilecgonina	0,2	9	18
Morfina	0,6	4	8
Codeína	0,6	4	8

A precisão intra-ensaio foi avaliada através da análise de cinco replicatas em um único dia, enquanto que a precisão inter-ensaio foi determinada pela avaliação de cinco replicadas por três dias consecutivos. Os resultados de precisão foram expressos como coeficiente de variação - CV% e calculados através da análise de variância – ANOVA fator único.

A exatidão foi determinada a partir da quantificação de cinco replicatas de cada nível de controle utilizando a curva de calibração previamente realizada. Os resultados foram expressos como porcentagem da concentração conhecida, isto é, $[(\text{concentração média medida} - \text{concentração nominal}) / \text{concentração nominal}] \times 100$.

O critério de aceitação tanto para precisão quanto exatidão foi de 20% para os controles baixos e 15% para cada os controles meio e alto.

Integridade de Diluição

Este estudo foi realizado somente para a classe dos barbitúricos através da análise de amostras adicionadas, em triplicata, nas concentrações de 40 ng/mg and 20 ng/mg a partir de alíquotas de cabelo de 10 mg e 20 mg, respectivamente. Exatidão e precisão permaneceram dentro dos critérios estabelecidos, ou seja, dentro com CV < 15%.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Confirmação de anfetaminas por GC-MS

O método de escolha para confirmação das anfetaminas em cabelo por GC-MS foi o desenvolvido por Pantaleão, Paranhos e Yonamine (2012) devido este ter sido completamente validado no mesmo laboratório em que o projeto está situado, sendo possível aplica-lo as finalidades propostas. O método também compreende todos os analitos de interesse, sendo estes a anfetamina, metanfetamina, MDMA e MDA, e os valores de *cut-off* pré-estabelecidos pela SoHT (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

Além disso, o método desenvolvido utiliza a digestão alcalina da matriz, processo de escolha para compostos estáveis como as anfetaminas (CURTIS; GREENBERG, 2008; BOUMBA; ZIAVROU; VOUGIOUKLAKIS, 2006; MUSSHOF; MADEA, 2007; PRAGST; BALIKOVA, 2006) e *clean up* das amostras através da técnica de LPME, a qual apresenta simplicidade, menor manipulação da amostra e de volume de solventes orgânicos (PEDERSEN-BJERGAARD; RASMUSSEN, 2005).

As análises foram realizadas no equipamento GC-MS – *Thermo Fisher Scientific*, de acordo com os parâmetros cromatográficos e do espectrômetro de massas descrito na metodologia. A **figura 8** apresenta o cromatograma obtido da análise da amostra extraída adicionada dos padrões de anfetaminas em estudo na concentração de 5 ng/mg de cabelo.

Figura 8: Cromatograma obtido pela análise de cabelo por LPME adicionado dos padrões de anfetaminas na concentração de 5,0 ng/mg. **A:** Anfetamina-d5 e anfetamina (TR: 8,36); **B:** Metanfetamina (TR: 9,64); **C:** MDA (TR: 12,43); **D:** MDMA-d5 e MDMA (TR: 13,54 e 13,55). **Legenda:** TR – tempo de retenção.

Para quantificar as amostras tanto reais como artificiais foi realizado curvas de calibração contemplando três pontos da curva de linearidade, sendo estes 0,2 ng/mg (*cut-off*), 5,0 ng/mg e 10 ng/mg, em triplicata, aplicando o fator de ponderação de $1/x^2$ (valor reportado durante a validação do método). Os resultados encontrados foram reportados no **item 7.6**.

7.2 Confirmação de barbitúricos por GC-MS

Poucos são os métodos desenvolvidos para a detecção de barbitúricos em amostras de cabelo, tendo como consequência a inexistência de valores de *cut-off* pré-estabelecidos para esta classe de analitos. Diante deste cenário, fez-se necessário o desenvolvimento de método de confirmação para barbitúricos em amostras de cabelo por GC-MS (ROVERI; PARANHOS; YONAMINE, 2016).

A literatura aponta métodos como a incubação com água (GAILLARD; PEPIN, 1997), com bicarbonato de sódio (FRISON et al., 2003) e mais recentemente com a mistura de solventes (MONTESANO; JOHANSEN; NIELSEN, 2014) para se realizar a

extração de barbitúricos da matriz do cabelo, entretanto a digestão alcalina, como já mencionado, é o método de escolha para analitos estáveis a estas condições, como demonstrado por Saisho, Tanaka e Nakahara (2001), onde a utilização de NaOH 1 mol/L produziu maior recuperação de fenobarbital em comparação aos demais agentes de extração.

Por esta razão as amostras sofreram digestão por NaOH 1mol/L e a partir daí seguiram para o processo de *clean up*. A técnica de escolha para se realizar esta etapa foi a técnica de LPME, devido não somente as vantagens já mencionas como também a sua utilização para a extração de barbitúricos em trabalhos passados, conforme descrito por Menck et al. (2012).

Para a etapa de derivatização, o agente escolhido foi o TMAH, por este ser o derivatizante de preferência para esta classe de substâncias devido a sua forte interação com os átomos de nitrogênio presentes nas moléculas (SIGMA, 2001). Os autores, Saisho, Tanaka e Nakahara (2001) e Menck et al. (2012), também relataram o uso de TMAH para os barbitúricos.

Após definir as etapas de digestão, *clean up* e derivatização, foi realizado a configuração do método no equipamento GC-MS – *Thermo Fisher Scientific*, de acordo com os parâmetros cromatográficos e do espectrômetro de massas descrito na metodologia e também a sua validação. A **figura 9** apresenta o cromatograma obtido da análise da amostra extraída adicionada dos padrões de barbitúricos em estudo na concentração de 5 ng/mg de cabelo.

Figura 9: Cromatograma obtido pela análise de cabelo por LPME adicionado dos padrões de barbitúricos na concentração de 5,0 ng/mg. **A:** Pentobarbital-d5 e pentobarbital (TR: 5,82 e 5,85); **B:** Secobarbital-d5 e secobarbital (TR: 6,15 e 6,18); **C:** Fenobarbital-d5 e fenobarbital (TR: 7,55 e 7,57).

Os principais parâmetros de validação encontram-se resumidos na **Tabela 7**.

Tabela 7. Parâmetros de validação do método desenvolvido para a determinação de barbitúricos em amostras de cabelo.

Analitos	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)		Precisão (CV%)		Exatidão (%)
				Intra-ensaio	Inter-ensaio	
Fenobarbital	0,10	0,25	CB	4,6	5,8	102,3
			CM	2,8	3,3	99,6
			CA	4,2	4,0	98,9
Secobarbital	0,10	0,25	CB	3,5	4,4	90,4
			CM	2,3	4,2	89,3
			CA	5,0	8,7	86,4
Pentobarbital	0,10	0,25	CB	4,6	4,8	93,9
			CM	2,8	3,5	97,2
			CA	2,5	2,4	91,9

Legenda: LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; CB: controle baixo; CM: controle médio; CA: controle alto; CV: coeficiente de variação.

Durante a validação, nenhum interferente endógeno ou exógeno foi observado no tempo de retenção dos compostos de interesse, sendo o método assim seletivo. Não foram encontrados vestígios de *carryover*. O ensaio de integridade de diluição apresentou resultados de exatidão (<5%) e precisão (<7%) dentro dos critérios estabelecidos.

Os LOD e LOQ (0,1 e 0,25 ng/mg, respectivamente) foram considerados adequados para o estudo e podem ser comparados com outros métodos reportados pela literatura que também aplicaram cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, variando entre 0,03 - 1,0 ng/mg para LOD (SAISHO; TANAKA; NAKAHARA, 2001; FERRARI et al., 2015; GOULLE et al., 1995). Além disso, devido à falta de valores de *cut-off* para esta classe de analitos, o LOQ do método foi comparado aos valores encontrados em estudos de relato de caso também se mostrando satisfatórios (GAILLARD; PÉPIN, 1997; FRISON et al., 2003; SAISHO; TANAKA; NAKAHARA, 2001)

O método foi linear para todos os analitos, com coeficiente de determinação >0,99. O fenômeno de heterocedasticidade foi observado por meio do *F-test* (ALMEIDA; CASTEL-BRANCO; FALCAO, 2002). O fator de ponderação encontrado foi de 1/y (fenobarbital) e 1/x (secobarbital e pentobarbital). As equações e os coeficientes de correlação foram: $y = 0,0118 + 0,5851x$, $r^2 = 0,9974$ (fenobarbital); $y = 0,1121 + 0,4486x$, $r^2 = 0,9902$ (secobarbital); $y = 0,1332 + 0,6765x$, $r^2 = 0,9939$ (pentobarbital); onde Y e X representam a relação entre a razão da área do pico (analito/padrão interno) e as concentrações correspondentes, respectivamente.

A precisão e exatidão do método foram avaliadas para todos os analitos de acordo com os diferentes níveis de controle (CB, CM e CA). A precisão intra e inter ensaio foi inferior a 10% (CV%) nos três níveis avaliados para todos os analitos. Já a exatidão variou de 86,4 a 102,3%. Ambos os ensaios se apresentaram dentro dos critérios de aceitação internacional (CV% < 20%).

Após a validação completa do método, cinco amostras reais foram analisadas, além da amostra artificial. Para isso, foi realizado curvas de calibração contemplando três pontos da curva de linearidade, sendo estes 0,25 ng/mg (LOQ), 5,0 ng/mg e 10 ng/mg, em triplicata, aplicando os fatores de ponderação encontrados durante a validação do método. Os resultados encontrados foram reportados no **item 7.6**.

O desenvolvimento, validação e aplicação do método proposto foram publicados na forma de artigo científico na revista *Forensic Science Internacional* (Anexo E).

7.3 Confirmação de benzodiazepínicos por GC-MS

O método de escolha para confirmação dos benzodiazepínicos em cabelo por GC-MS foi o desenvolvido e validado no mesmo laboratório em que o projeto está situado, sendo possível aplicá-lo as finalidades propostas (PANTALEÃO, 2012). O método também compreende todos os analitos de interesse, sendo estes o diazepam, nordiazepam e oxazepam e os valores de *cut-off* pré-estabelecidos pela SoHT (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

O método de extração empregado, metanol:acetonitrila:NH₄OH (10:10:1), foi reportado como o de melhor situação extrativa quando comparado com outros métodos da literatura, como tampão fosfato pH 5,0; mistura de metanol:NH₄OH (10:1); metanol:TFA (10:1); metanol:acetonitrila:NH₄OH (5:5:1); formiato de amônio em metanol e acetato de amônio em metanol (PANTALEÃO, 2012).

As análises então foram realizadas no equipamento GC-MS – *Agilent Technologies*, de acordo com os parâmetros cromatográficos e do espectrômetro de massas descrito na metodologia. A **figura 10** apresenta o cromatograma obtido da análise da amostra extraída adicionada dos padrões de benzodiazepínicos em estudo na concentração de 5 ng/mg de cabelo.

Figura 10: Cromatograma obtido pela análise de cabelo por SPE adicionado dos padrões de benzodiazepínicos na concentração de 5,0 ng/mg. **A:** Diazepam-d5 e diazepam (TR: 7,08 e 7,09); **B:** Nordiazepam (TR: 7,24); **C:** Oxazepam (TR: 8,29).

Desta forma, para quantificar as amostras tanto reais como artificiais foi realizado curvas de calibração contemplando três pontos da curva de linearidade, sendo estes 0,05 ng/mg (*cut-off*), 5,0 ng/mg e 10 ng/mg, em triplicata, aplicando o fator de ponderação de $1/x^2$ (valor reportado durante a validação do método). Os resultados encontrados foram reportados no **item 7.6**.

7.4 Confirmação de cocaína e seus produtos de biotransformação por GC-MS

O método desenvolvido em parceria com a doutoranda Ana Miguel Pego Fonseca para confirmação de cocaína, AEME, cocaetileno e benzoilecgonina em cabelo por GC-MS foi baseado no método de Toledo et al. (2003) com adaptações. Este compreende incubação das amostras em metanol e *clean up* pela técnica de LPME.

O processo de incubação das amostras durante um período prolongado – *overnight* – seja por solução aquosa (IMBERT et al., 2014; CORDERO; PATERSON, 2007; MILLER et al., 2008; AGIUS; NADULSKI, 2012; COGNARD et al., 2005; MEROLA et al., 2010; ROMOLO et al., 2003) ou por metanol (PUJOL et al., 2007; GAMBELUNGHE et al., 2005; SKENDER et al., 2002; LACHENMEIER; MUSSHOF; MADEA, 2006; ALEKSA et al., 2012; POON et al., 2012; MUSSHOF et al., 2009) já é consolidado pela literatura para a extração de diversos analitos, mas principalmente de cocaína e seus produtos de biotransformação. No presente método, metanol foi utilizado como solvente de escolha, devido tanto à sua eficiência de extração, quanto de evaporação frente as soluções aquosas, contribuindo para a etapa seguinte de derivatização.

O processo de derivatização se faz necessário devido as características físico-químicas da benzoilecgonina e foi baseado no método proposto por Toledo et al. (2003) o qual utiliza como agente derivatizante o butilcloroformato em conjunto com acetonitrila e piridina. Nesta reação o butilcloroformato reage com o ácido carboxílico da benzoilecgonina para produzir um produto final designado butilbenzoilecgonina, sendo a piridina o catalisador da reação (HUSEK, 1991; HALL; PARIKH; BRODBELT, 1999).

A derivatização da benzoilecgonina proporciona não somente um aumento significativo na sensibilidade no método, mas também neste caso particular, permite a extração deste analito pela técnica de interesse no estudo, a LPME. Por se tratar de

um composto naturalmente anfótero, a benzoilecgonina é comumente extraída pela técnica de SPE, especialmente por cartuchos de fase mista que permitem tanto a sua extração quanto da própria cocaína e outros produtos de biotransformação (ALESKA et al., 2012; MUSSHOF et al., 2009; LÓPEZ-GUARNIDO et al., 2013; GOUVEIA et al., 2012; BARROSO et al., 2008).

Embora a técnica de extração por SPE seja amplamente utilizada, técnicas miniaturizadas como a LPME e a SPME são a tendência atual, como já mencionado (BACIU et al., 2015). A utilização da técnica de SPME para extração de cocaína e seus produtos de biotransformação em cabelo já foi reportada com sucesso por alguns autores (TOLEDO et al., 2003; POON et al., 2014; MEROLO et al., 2010; BERMEJO et al., 2006). Entretanto o baixo custo/benefício e os efeitos de *carryover* relacionados a fibra representam um ponto fraco para a técnica (XIONG et al., 2010), havendo assim um apelo para que outras técnicas miniaturizadas sejam exploradas como a LPME.

Além disso, a técnica de LPME já se mostrou promissora para a análise de outros compostos em amostras em cabelo como as anfetaminas (PANTALEÃO et al., 2012) e os barbitúricos (ROVERI; PARANHOS; YONAMINE, 2016).

Após definir as etapas de digestão, *clean up* e derivatização, foi realizado a configuração do método no equipamento GC-MS – *Agilent Technologies*, de acordo com os parâmetros cromatográficos e do espectrômetro de massas descrito na metodologia e também a sua validação. A **figura 11** apresenta o cromatograma obtido da análise da amostra extraída adicionada dos padrões de cocaína em estudo na concentração de 5 ng/mg de cabelo.

Figura 11: Cromatograma obtido pela análise de cabelo por LPME adicionado dos padrões cocaína na concentração de 5,0 ng/mg. **A:** AEME (TR: 6,85); **B:** Cocaína-d3 e cocaína (TR: 12,92 e 12,94); **C:** Cocaetileno-d3 e cocaetileno (TR: 13,40 e 13,41); **D:** Benzoilecgonina-d3 e benzoilecgonina (TR: 14,82 e 14,83).

Os principais parâmetros de validação encontram-se resumidos na **Tabela 8**.

Tabela 8. Parâmetros de validação do método desenvolvido para a determinação de cocaína e seus produtos de biotransformação em amostras de cabelo.

Analitos	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)		Precisão (CV%)		Exatidão (%)
				Intra-ensaio	Inter-ensaio	
Cocaína	0,1	0,5	CB	5,9	7,5	99,6
			CM	1,5	4,2	94,3
			CA	3,4	4,2	97,6
AEME	0,4	0,5	CB	6,2	12,9	93,5
			CM	6,9	14,4	96,3
			CA	11,9	12,07	95,6
Cocaetileno	0,03	0,05	CB	2,7	2,6	94,3
			CM	3,3	3,9	94,4
			CA	4,0	5,0	99,1
Benzoilecgonina	0,05	0,05	CB	2,2	2,1	84,5
			CM	2,1	2,8	97,6
			CA	4,1	4,8	97,5

Legenda: LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; CB: controle baixo; CM: controle médio; CA: controle alto; CV: coeficiente de variação.

Os LOD e LOQ foram considerados adequados para o estudo uma vez que contemplam os valores de *cut-off* preconizados pela SoHT (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012). Os valores de LOD obtidos neste método foram de 0,1; 0,4; 0,03 e 0,05 ng/mg enquanto que os valores de LOQ alcançados foram de 0,5; 0,5; 0,05 e 0,05 ng/mg para cocaína; AEME; cocaetileno e benzoilecgonina, respectivamente. Para AEME não existem valores de *cut-off* pré-estabelecidos, entretanto considerando o padrão de uso de *crack*, acredita-se que estes valores são adequados.

A precisão e exatidão do método foram avaliadas para todos os analitos de acordo com os diferentes níveis de controle. A precisão intra-ensaio variou entre uma faixa de 1,5 a 11,9% e a inter-ensaio entre 2,1 a 14,4% nos três níveis avaliados para todos os analitos. Os maiores valores encontrados foram atribuídos ao AEME devido provavelmente a falta de padrão interno deuterado próprio (sendo utilizado o cocaetileno-d3). Para a exatidão os resultados variaram de 84,5 (CB – benzoilecgonina) a 99,6% (CB – cocaína). Ambos os ensaios se apresentaram dentro dos critérios de aceitação internacional de validação (SWGTOX, 2013; UNODC, 2009).

A faixa de linearidade compreendeu o LOQ do método até 20 ng/mg para cocaína e AEME. Para cocaetileno e benzoilecgonina foram utilizadas duas faixas de linearidade devido a distante ordem de grandeza entre os pontos, sendo a primeira do LOQ até 1 ng/mg e a outra do LOQ até 20 ng/mg. O método se mostrou linear para todos os analitos, com coeficiente de determinação (r^2) >0,99. O fenômeno de heterocedasticidade foi observado por meio do *F-test*. As faixas de concentração, as equações, os fatores de ponderação, e os coeficientes de determinação são apresentados na **tabela 9**. Os valores de Y e X representam a relação entre a razão da área do pico (analito/padrão interno) e as concentrações correspondentes, respectivamente.

Tabela 9: Resultados referentes aos ensaios de linearidade do método proposto.

Analitos	Faixa de concentração	Equação	Fator de Ponderação	r ²
Cocaína	LOQ até 20 ng/mg	y= 0,5505x - 0,0052	1/x	0,999
AEME	LOQ até 20 ng/mg	y= 0,5765x + 0,009	Homocedastico	0,995
Cocaetileno	LOQ até 1,0 ng/mg	y= 0,5804x + 0,015	Homocedastico	0,999
	LOQ até 20 ng/mg	y= 0,5281x + 0,0049	1/y ²	0,998
Benzoilecgonina	LOQ até 1,0 ng/mg	y= 0,5758x + 0,021	Homocedastico	0,997
	LOQ até 20 ng/mg	y= 0,4901x + 0,0283	1/x	0,991

Legenda: LOQ: limite de quantificação; r²: coeficiente de determinação.

Após a validação completa do método, onze amostras reais foram analisadas, além da amostra artificial. Para isso, foi realizado curvas de calibração contemplando três pontos da curva de linearidade, sendo estes o LOQ, 0,4 ng/mg e 1,0 ng/mg (para cocaetileno e benzoilecgonina) e LOQ, 10 ng/mg e 20 ng/mg (para todos os analitos) em triplicata, aplicando os fatores de ponderação encontrados durante a validação do método. Os resultados encontrados foram reportados no **item 7.6**.

O desenvolvimento, validação e aplicação do método proposto foram submetidos e aceitos para publicação na revista *Forensic Science Internacional*.

7.5 Confirmação de opiáceos por GC-MS

O método de escolha para se realizar a confirmação de opiáceos foi baseado nos métodos propostos por Miller, Wylie e Oliver (2008), Romolo et al. (2003), e Imbert et al. (2014), que consistem em incubação das amostras com solução tampão fosfato pH 5,0 0,1mol/L e *clean up* dos extratos pela técnica de SPE.

Outros diferentes métodos de incubação já foram reportados pela literatura para a extração dos analitos de interesse, sendo os mais comuns a incubação por metanol (SKENDER et al., 2002; PUJOL et al., 2007; SALOMONE et al., 2012) ou por solução de ácida - HCl (MONTAGNA et al., 2002; CORDEIRO; PATERSON, 2007; TSANACLIS; WICKS, 2008). Entretanto os métodos apresentados possuem algumas

desvantagens como a baixa recuperação dos analitos e extratos mais sujos, no caso do uso metanol e degradação de substâncias como a heroína, na incubação por HCl (ROMOLO et al., 2003). Desta forma, o uso de tampão fosfato pH 5,0 para a extração dos analitos tornou-se o método de escolha frente aos resultados como, boa estabilidade e recuperação dos analitos e promoção de extratos mais limpos, reportados por Miller, Wylie e Oliver (2008), Maublanc et al. (2014), Romolo et al. (2003) e Imbert et al. (2014).

Já a técnica de escolha para se realizar a etapa de *clean up* das amostras foi a de SPE. Além dos autores Miller, Wylie e Oliver (2008), Romolo et al. (2003) e Imbert et al. (2014) relatarem o sucesso no emprego desta técnica em suas análises, esta por sua vez também foi a de escolha por se tratar de uma técnica simples, robusta e de preferência para substâncias com caráter anfótero, como os analitos em questão.

Para finalizar, a etapa de derivatização foi definida com o uso do agente derivatizante BSTFA: 1%TCMS, devido a sua grande versatilidade, pois é capaz de promover a reação de uma gama de compostos orgânicos polares, através da substituição de átomos de hidrogênio ativos (-HO e -HN) com seu grupo trimetilsilil (SIGMA, 2011).

Após definir as etapas de digestão, *clean up* e derivatização, foi realizado a configuração do método no equipamento GC-MS – *Agilent Technologies*, de acordo com os parâmetros cromatográficos e do espectrômetro de massas descrito na metodologia e também a sua validação. A **figura 12** apresenta o cromatograma obtido da análise da amostra adicionada dos padrões de opiáceos em estudo na concentração de 5 ng/mg de cabelo.

Figura 12: Cromatograma obtido pela análise de cabelo por SPE adicionado dos padrões de opiáceos na concentração de 5,0 ng/mg. **A:** Codeína-d3 e codeína (TR:7,79 e 7,8); **B:** Morfina-d3 e morfina (TR: 8,24 e 8,25).

Os principais parâmetros do método validado encontram-se resumidos na **Tabela 10**.

Tabela 10. Parâmetros de validação do método desenvolvido para a determinação de opiáceos em amostras de cabelo.

Analitos	LOD (ng/mg)	LOQ (ng/mg)		Precisão (CV%)	Exatidão (%)
Codeína	0,1	0,2	CB	2,6	83,5
			CM	3,1	87,7
			CA	11,5	89,2
Morfina	0,1	0,2	CB	2,9	87,3
			CM	5,77	89,6
			CA	9,9	90,7

Legenda: LOD: limite de detecção; LOQ: limite de quantificação; CB: controle baixo; CM: controle médio; CA: controle alto; CV: coeficiente de variação.

Os LOD e LOQ (0,1 e 0,2 ng/mg, respectivamente) foram considerados adequados para o estudo uma vez que contemplam valor de *cut-off* preconizado pela SoHT, de 0,2 ng/mg de cabelo (COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

A precisão e exatidão do método foram avaliadas para todos os analitos de acordo com os diferentes níveis de controle (CB, CM e CA). A precisão intra ensaio variou entre uma faixa de 2,6 a 11,5% (CV%) nos três níveis avaliados para todos os analitos. Já a exatidão variou de 86,4 a 102,3%. Ambos os ensaios se apresentaram dentro dos critérios de aceitação internacional de validação (SWGTOX, 2013; UNODC, 2009).

A faixa de linearidade compreendeu o LOQ do método até 10 ng/mg. O método foi linear para todos os analitos, com coeficiente de determinação $>0,99$. O fenômeno de heterocedasticidade foi observado por meio do *F-test*. O fator de ponderação encontrado foi de $1/y^2$ tanto para codeína quanto para morfina. As equações e os coeficientes de determinação foram: $y = 0,4167x + 0,0259$, $r^2 = 0,9953$ (codeína); $y = 0,4486x + 0,0186$, $r^2 = 0,9927$ (morfina); onde Y e X representam a relação entre a razão da área do pico (analito/padrão interno) e as concentrações correspondentes, respectivamente.

O método se apresentou também seletivo pois nenhum interferente endógeno ou exógeno foi observado no tempo de retenção dos compostos de interesse. Não foram encontrados vestígios de *carryover* nas amostras “branco” injetadas após uma amostra de alta concentração (10 ng/mg).

Após a validação completa do método, quatro amostras reais foram analisadas, além da amostra artificial. Para isso, foi realizado curvas de calibração contemplando três pontos da curva de linearidade, sendo estes 0,2 ng/mg (*cut-off*), 5,0 ng/mg e 10 ng/mg, em triplicata, aplicando o fator de ponderação de $1/y^2$. Os resultados encontrados foram reportados no **item 7.6**.

Os resultados da validação e aplicação do método proposto foram apresentados no XII TIAFT LATINOAMERICANO – Costa Rica 2016, na modalidade “apresentação oral”, onde concorreu ao prêmio jovem cientista.

7.6 Resultado das análises confirmatórias em amostras reais

As amostras de cabelo dos voluntários que relataram o uso das substâncias psicoativas de interesse foram submetidas aos métodos desenvolvidos e validados. Os resultados das análises encontram-se na **tabela 11**.

Tabela 11: Resultados da análise das amostras de cabelo de voluntários que relataram consumo das substâncias de interesse.

Amostras	Resultado (ng/mg)
ANF 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8	NEGATIVO
BARB 1	POSITIVO - 9,5 ng/mg (FENO)
BARB 2	NEGATIVO
BARB 3	POSITIVO - 15,1 ng/mg (FENO)
BARB 4	POSITIVO - 16,3 ng/mg (FENO)
BENZ 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7	NEGATIVO
COC 1, 2, 3 e 4	NEGATIVO
COC5	POSITIVO - 1,6 ng/mg (AEME); 4,7 ng/mg (COC); 0,6 ng/mg (BZE)
COC6	POSITIVO - 4,9 ng/mg (AEME); > 20 ng/mg (COC); 7,7 ng/mg (BZE)
COC7	POSITIVO - 0,2 ng/mg (AEME); > 20 ng/mg (COC); > 20 ng/mg (BZE); 3,9 ng/mg (CE)
COC8	POSITIVO - 0,2 ng/mg (AEME); 9,1 ng/mg (COC); 0,9 ng/mg (BZE); 0,2 ng/mg (CE)
COC9	POSITIVO - 0,5 ng/mg (AEME); 15,2 ng/mg (COC); 1,6 ng/mg (BZE); 0,1 ng/mg (CE)
COC10	POSITIVO - 0,7 ng/mg (COC); 0,1 ng/mg (BZE)
COC11	POSITIVO - 1,4 ng/mg (COC) ; 0,4 ng/mg (BZE); 0,9 ng/mg (CE)
OPI 1, 2 e 3	NEGATIVO
OPI 4	POSITIVO - 0,41 ng/mg (COD).

Legenda: ANF - amostras possivelmente positivas para a classe das anfetaminas; BARB - amostras possivelmente positivas para a classe dos barbitúricos; FENO - fenobarbital; BENZ - amostras possivelmente positivas para a classe dos benzodiazepínicos; COC - amostras possivelmente positivas para cocaína; COC – cocaína; CE – cocaetilenos; OPI - amostras possivelmente positivas para os opiáceos; COD – codeína.

Pelos dados apresentados pode-se notar que o grande número de amostras positivas foi para os voluntários que relataram o uso de cocaína. Este achado faz total sentido visto que o número de usuários para esta classe de substâncias cresceu no Brasil nos últimos anos (INPAD, 2014). Além disso, as amostras coletadas foram provenientes do Centro de Tratamento de Dependência Química – Vila Serena, onde a quase totalidade dos pacientes está sob internação em decorrência da dependência de cocaína e álcool. Este fato também favoreceu para que houvesse um número baixíssimo ou quase nenhum de amostras positivas para as outras classes de substâncias, prejudicando a aplicação do trabalho.

Resultados positivos também foram encontrados para fenobarbital. As amostras coletadas foram provenientes de pacientes que faziam uso crônico desse medicamento devido ao tratamento contra epilepsia.

Apesar disso outras amostras foram coletadas para as demais classes de drogas, entretanto outros problemas foram encontrados. O primeiro deles foi a coleta, que embora não seja invasiva quando comparada com as mais tradicionais, como sangue e urina, afeta a estética dos voluntários. Este problema foi enfrentado tanto para a coleta em homens quanto para mulheres.

Nos homens, o fator comprimento da matriz foi determinante pois para se atingir o volume necessário de amostra era preciso cortar uma quantidade que realmente afetasse a estética capilar. Já para as mulheres, mesmo apresentando cabelo mais comprido, não permitiam a coleta de volumes muito grandes, prejudicando a coleta como um todo.

Visto que o trabalho proposto fez ensaios tanto de triagem como de confirmação, para uma mesma amostra, o volume de aproximadamente 100 mg de cabelo foi necessário para se atingir o objetivo proposto, o que limitou tanto o número de amostras quanto os resultados obtidos. Embora a literatura reporte o uso de alíquotas menores para diversos trabalhos no desenvolvimento dos métodos confirmatórios, estes utilizaram de equipamentos de maior sensibilidade, como LC-MSMS, conseguindo assim atingir os baixos valores de *cut-off* requeridos para essa matriz (FAVRETTO et al., 2011; MONTESANO; JOHANSEN; NIELSEN, 2014; FERNANDEZ et al., 2014). O mesmo feito não foi possível para os métodos desenvolvidos neste trabalho, havendo assim a necessidade de alíquotas de 50 mg para se realizar os ensaios confirmatórios. Essa quantidade de amostra também foi observada em outros

trabalhos que utilizam GC-MS (MUSSHOFF et al., 2009; PANTALEÃO et al., 2012; MIGUEL-FRAMIL et al., 2013; LOPEZ-GUARNIDO et al., 2013; ROMANO et al., 2014).

Além da questão da quantidade de amostra, quase todas as mulheres voluntárias apresentaram algum tipo de tratamento cosmético que como já relatado faz com que as concentrações incorporadas de xenobióticos diminuam potencialmente, favorecendo a resultados falso- negativos.

Todas essas dificuldades também foram apresentadas pelos voluntários que reportaram o uso tanto de cocaína quanto de fenobarbital; entretanto o padrão de uso destas substâncias foi o fator determinante para a diferença no número de resultados positivos quando comparado com as demais.

O uso crônico reportado por estes voluntários favoreceu a detecção das substâncias de interesse uma vez que concentrações mais altas são incorporadas a esta matriz quando comparado aos voluntários que relataram uso esporádico das demais drogas. Além disso, a segmentação da matriz se torna mais fácil e abrangente em usuários crônicos uma vez que qualquer segmento apresentará um resultado positivo. Infelizmente os voluntários que reportaram o uso de anfetaminas (no caso, MDMA), benzodiazepínicos e opiáceos fizeram o uso dessas substâncias de maneira esporádica, o que dificultou também a segmentação da matriz e o volume coletado. Somente uma amostra de uso não crônico apresentou resultado positivo, sendo este para codeína, com concentração de 0,41 ng/mg.

Já para as amostras que apresentaram resultado positivo para cocaína não só foram observados se as concentrações encontradas estavam acima dos valores de *cut-off* como também se havia a presença de algum produto de biotransformação na amostra, como benzoilecgonina e cocaetileno. Além disso, a água de lavagem dessas amostras também foi analisada não apresentando qualquer indício de contaminação. Todo esse cuidado se deve ao grande problema de contaminação externa relacionado a drogas que podem ser fumadas, sendo a cocaína (*crack*) uma das classes que mais apresentam essa problemática.

De fato, todas as amostras reportadas como positivas tiveram sua água de lavagem analisada e nenhuma delas apresentou resultado considerado crítico. Para as amostras positivas para fenobarbital, além da água de lavagem, foram consideradas positivas aquelas que apresentassem concentração superior ao LOQ do método, uma vez que não existem valores de *cut-off* para esta classe de substâncias.

7.7 Resultado das análises toxicológicas em cabelo em amostras artificiais

As amostras que foram produzidas artificialmente no laboratório também foram submetidas aos métodos desenvolvidos e validados. Os resultados das análises encontram-se na **tabela 12**

Tabela 12 Resultados obtidos pela análise de cabelo artificial adicionado de padrões analíticos de interesse.

Amostras artificiais	Concentração ng/mg
Anfetamina	0,7
Metanfetamina	0,8
MDMA	0,4
Fenobarbital	0,6
Diazepam	0,1
Cocaína	0,8
Morfina	0,8

O objetivo do preparo das amostras sempre foi obter concentrações de incorporação o mais próximo possível dos valores de *cut-off* pré-estabelecidos. As substâncias escolhidas para incorporação são apenas representativas, sendo seus dados extrapolados para as demais substâncias da sua classe devido as suas semelhanças físico-químicas.

A capacidade do DMSO em penetrar na matriz do cabelo e incorporar essas substâncias foi comprovada e embora não se possa relacionar a incorporação artificial com a natural as amostras produzidas proporcionaram resultados satisfatórios semelhantes aos resultados de uma amostra real.

A produção das amostras foi baseada em ensaios de tentativa e erro. Desta forma 3 concentrações diferentes foram inicialmente testadas para cada analito em 100 mg de cabelo, sendo elas 1,5 µg, 3 µg e 6 µg. Estas concentrações iniciais foram baseadas nas concentrações adicionadas e incorporadas reportadas pelo trabalho da NIST (WELCH; SNIEGOSKI; TAI, 2003).

A partir dos resultados obtidos nas primeiras análises é que foram estabelecidas quais concentrações seriam adicionadas para produzir uma grande quantidade de cabelo, que no caso foi de 1 grama de cabelo para cada analito. As quantidades adicionadas foram reportadas na **tabela 5** no **item 6.1 Preparo de cabelo artificial**.

As alíquotas de anfetamina e MDMA apresentaram resultados satisfatórios na produção de 1g de cabelo, com concentrações de 0,7 ng/mg e 0,4 ng/mg respectivamente. Já a metanfetamina apresentou concentração de 1,2 ng/mg, sendo necessário incubar a alíquota por 3 horas à 50°C em metanol para então se obter a concentração de 0,8 ng/mg (mais próxima do *cut-off*).

Já a incorporação de fenobarbital foi um pouco mais crítica. Após os testes iniciais, ficou estabelecido que a adição de 15 µg seria satisfatória para a incorporação desejada. Entretanto nem 15 µg e nem 60 µg foram capazes de incorporar a matriz, sendo necessário a adição de 100 µg para se alcançar a concentração de 0,6 ng/mg. Os únicos motivos para essa mudança nas taxas de incorporação seriam o excesso de lavagem com metanol, o que poderia ter retirado o fenobarbital da matriz e a diferença de superfície de contato, devido a maior quantidade de cabelo adicionada.

Situação análoga ocorreu com a incorporação de morfina. A adição de 15 µg também não foi suficiente para incorporar o analito a matriz, contrariando os resultados de incorporação encontrados previamente. Neste caso, foi adicionado no novo experimento 120 µg de morfina, apresentando assim uma concentração 5,4 ng/mg. Com concentração muito acima do desejado a alíquota foi incubada pelo período de 9 horas à 50°C com metanol e sua concentração final foi para 0,8 ng/mg. As razões para a diferença de incorporação também podem ser os mesmos encontrados para fenobarbital.

A amostra artificial utilizada para diazepam foi produzida previamente no laboratório pela aluna então de mestrado Lorena Pantaleão. A amostra foi então quantificada apresentando uma concentração de 41,5 ng/mg. Após diversos períodos de incubação, na tentativa de se diminuir esta concentração, o valor mais baixo alcançado foi de 2,6 ng/mg. Para se contornar o problema foi adicionado a cada alíquota de 2 mg de cabelo artificial 23 mg de cabelo referência negativa, proporcionando uma concentração final de 0,11 ng/mg.

E por fim a incorporação de cocaína, assim como a de anfetamina e MDMA, apresentou resultados satisfatórios na produção de 1 g de cabelo, com concentrações de 0,8 ng/mg, não havendo a necessidade de ajustes na concentração.

8 MÉTODOS

8.1 Triagem por imunoensaio

Todas as amostras utilizadas nesta etapa foram coletadas, armazenadas, descontaminadas e analisadas por ensaios confirmatórios, conforme descrito no **item 6** deste trabalho.

Após este processo inicial, alíquotas de 25 mg de cabelo foram separadas e avaliadas pelo método de imunoensaio. As análises foram realizadas para 4 grupos de amostras, sendo eles (1) amostras “branco” (referência negativa); (2) amostras adicionadas (sempre nos valores de *cut-off* para cada classe de substâncias); (3) amostras artificiais; e (4) amostras positivas – reais.

Antes de serem aplicadas ao imunoensaio as amostras passaram por diferentes métodos de digestão/extração com a intenção de se avaliar qual deles seria o mais adequado para a aplicação do *kit*. Os métodos avaliados estão apresentados na **tabela 13**.

Tabela 13: Métodos de extração/digestão avaliados pelo método de imunoensaio.

REFERÊNCIA	CLASSE DE SUBSTÂNCIAS	EXTRAÇÃO DA MATRIZ
PANTALEÃO; PARANHOS; YONAMINE, 2012.	Anfetamina, metanfetamina e MDMA	Digestão com NaOH 1mol/L (1mL) por 15 min à 70°C seguida de técnica de extração LPME.
LENDIRO et al., 2012	Cocaína, morfina, diazepam e anfetaminas	Incubação com Acetonitrila (1mL) por 12 horas à 50°C
COOPER et al., 2005; SALOMONE et al., 2012; DI CORCIA et al., 2012.	Cocaína, morfina, diazepam e anfetaminas	Incubação com Metanol (1mL) por 18 horas à 50 °C.

Após se realizar o método de extração, todas as amostras foram transferidas para *vials* e concentradas em fluxo de N₂. Para se aplicar os extratos obtidos ao imunoensaio estes foram ressuspensas com 65 uL de diluente de amostra RANDOX, inseridas no Biochip e analisadas através do equipamento *Evidence Investigator*. A **figura 13** representa em detalhes este processo.

Figura 13: Representação esquemática do procedimento de análise para o *Kit DOA I WB Plus* (Fonte: adaptado de RANDOX, 2009).

Antes de se realizar qualquer análise foram construídas curvas de calibração para todos os analitos. O *kit DOA I WB P* possui 9 calibradores, sendo estes ressuspendidos e processados como descrito na **figura 27**. As curvas obtidas são do tipo regressão não-linear, sendo o critério de aceite - *curve fit* (r) > 0,98.

8.2 Avaliação dos dados

8.2.1 Análise Estatística

O imunoensaio deve apresentar a capacidade de diferenciar as amostras positivas das negativas e mais que isso, não permitir que reações cruzadas, tanto com outras substâncias como com a matriz, gere falsos resultados.

Sendo assim, foi aplicado aos dados obtidos, através do programa *GraphPad – Prism 6*, o teste de *Tukey* de comparação múltipla (*Tukey's multiple comparisons test*) para a construção dos gráficos, com nível de significância de $p < 0,05$.

8.2.2 Validação do método

A validação do método foi baseada em parâmetros já descritos por outros autores (GRÖNHOLM; LILLSUNDE, 2001; FERRARA et al., 1998; BAUMGARTNER et al., 2012; HAN et al., 2006;; PUJOL et al., 2007; COULTER et al., 2010) sendo eles:

- Sensibilidade (S): capacidade do teste em identificar amostras positivas.

$$S = \frac{\text{Verdadeiros Positivos}}{\text{Verdadeiros Positivos} + \text{Falsos Negativos}}$$

- Especificidade (E): capacidade do teste em identificar amostras negativas.

$$E = \frac{\text{Verdadeiros Negativos}}{\text{Verdadeiros Negativos} + \text{Falsos Positivos}}$$

- Exatidão (EX): É a proporção de acertos, ou seja, o total de amostras verdadeiramente positivas e verdadeiramente negativas, em relação às amostras estudadas.

$$EX = \frac{\text{Verdadeiros Positivos} + \text{Verdadeiros Negativos}}{\text{Total de Amostras}}$$

- Valor preditivo positivo (VPP): É a proporção entre amostras verdadeiramente positivas em relação a amostras positivas diagnosticadas pelo ensaio.

$$VPP = \frac{\text{Verdadeiros Positivos}}{\text{Verdadeiros Positivos} + \text{Falsos Positivos}}$$

- Valor preditivo negativo (VPN): É a proporção entre amostras verdadeiramente negativas em relação a amostras negativas diagnosticadas pelo ensaio.

$$VPN = \frac{\text{Verdadeiros Negativos}}{\text{Verdadeiros Negativos} + \text{Falsos Negativos}}$$

Além do que já foi descrito, os ensaios também foram avaliados segundo alguns parâmetros estabelecidos por guias internacionais SWGTOX e UNODC como LOD, reatividade cruzada e precisão.

9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

9.1 Avaliação preliminar

O grande volume de amostras provenientes de programas de prevenção, como em locais de trabalho, e agora no Brasil, para emissão de carteira de habilitação fazem dos testes de imunoensaio uma ferramenta fortemente requerida na rotina laboratorial.

Assim como no trabalho proposto, outros grupos de pesquisa sentiram a necessidade de se aplicar estes ensaios em sua rotina e também propuseram a adaptação de *kits* de imunoensaio originalmente desenvolvidos para outras matrizes para serem aplicados em cabelo. Tanto Pujol et al., (2007) quanto Lachenmeier, Musshoff e Madea, (2006) adaptaram testes do tipo ELISA, inicialmente para fluido oral, para estes serem aplicados em cabelo. Assim como o sangue, o fluido oral apresenta a presença dos analitos inalterados para sua detecção, facilitando a adaptação dos *kits*.

O equipamento *Evidence Investigator™*, juntamente com o painel DOA I WB P apresentam a capacidade de detectar semi-quantitativamente as substâncias anfetamina, metanfetamina, MDMA, barbitúricos, benzodiazepínicos, canabinoides, cocaína e opiáceos, demonstrada pela **tabela 14**, a qual também apresenta a reatividade cruzada para cada classe de substâncias analisadas, assim como seus valores de LOD fornecidos pelo *kit*.

Tabela 14. Características do painel de escolha - DOA I WB P.

Analitos	Reatividade Cruzada	Limite de Detecção	Cut-off
ANFETAMINA	Anfetamina 100% MDA (426%)	5,68 ng/mL ou 0,085 ng	5 ng
METANFETAMINA	Metanfetamina (100%)	28,30 ng/mL ou 0,42 ng	5 ng
MDMA	MDMA (100%)	7,03 ng/mL ou 0,105 ng	6,25 ng
BARBITÚRICOS	Fenobarbital (100%) Secobarbital (371%) Pentobarbital (151%)	6,64 ng/mL ou 0,097ng	12,5 ng
BENZODIAZEPÍNICOS	Diazepam (256%) Nordiazepam (317%) Oxazepam (100%)	1,22 ng/mL ou 0,018 ng	1,25 ng
CANABINOIDES	THC (1%) THCCOOH (100%)	7,59 ng/mL ou 0,114 ng	2 ng
COCAÍNA	Cocaína (84,8%) Benzoilecgonina (100%)	0,61 ng/mL ou 0,009 ng	12,5 ng
OPIÁCEOS	Morfina (100%) Codeína (106%)	1,8 ng/mL ou 0,027 ng/mL	5 ng

Legenda: MDA - 3,4-metilenodioxianfetamina; MDMA - 3,4-metilenodioxianfetamina; THC - Δ^9 -tetraidrocanabinol; THCCOOH - ácido 11-nor- Δ^9 -tetraidrocanabinol carboxílico (Fonte: adaptado de RANDOX, 2009).

A partir dos dados de reatividade cruzada foi possível avaliar quais analitos poderiam ser estudados, ou seja, quais poderiam ser detectados pelo painel de escolha e também se estes analitos correspondem às formas encontradas na matriz biológica cabelo. Todos os analitos apresentados se encontram de acordo, com exceção da classe de canabinoides a qual possui 100% de reatividade cruzada para o produto de biotransformação THCCOOH e apenas 1% para THC. Esta capacidade baixíssima de se detectar THC impossibilita o uso do *kit* para as análises em cabelo, pois como já mencionado, o produto inalterado é o que se encontra em maior quantidade na matriz

capilar, sendo este ponto ainda mais crítico para THCCOOC uma vez que substâncias mais polares e de caráter ácido apresentem taxas ainda menores de incorporação quando comparada com outras drogas.

Em relação aos limites de detecção do método, fez-se necessário a conversão da unidade de medida, devido o *kit* ser originalmente desenvolvido para sangue e expressar os resultados em ng/mL. Desta forma, foi calculado a partir dos dados fornecidos pelo *kit* o quanto em massa o analisador conseguiria detectar. Os valores encontrados estão apresentados na **tabela 14** em nanogramas.

Os valores de *cut-off* para triagem também foram convertidos em unidade de massa para que fosse possível se comparar com os valores do limite de detecção. Levando em consideração amostras de 25 mg de cabelo, todos os valores de *cut-off* estão acima dos LOD apresentados, com exceção mais uma vez do THCCOOH que apresenta valor de *cut-off* de 0,0002 ng/mg ou, para nível de comparação, 0,005 ng (SPIEHLER, 1999).

Pelo fato da classe dos barbitúricos não apresentar valor de *cut-off* pré-estabelecido pela SoHT ou outro órgão internacional, foi assumido para este trabalho como *cut-off* de triagem o valor do LOQ do método confirmatório desenvolvido para barbitúricos, sendo este de 0,25 ng/mg e detectável pelo *kit*.

Esta capacidade de detectar as substâncias psicoativas de interesse, alguns de seus produtos de biotransformação e os valores de *cut-off* já pré-estabelecidos foi verificada também na prática. Como já dito o painel DOA WB P I foi desenvolvido inicialmente para amostras de sangue total, e foi desta forma que os primeiros ensaios foram conduzidos. A ideia foi avaliar se os compostos e as quantidades mencionadas na bula do *kit* eram realmente detectáveis, independentemente, num primeiro momento, da matriz ser ou não cabelo. Amostras de sangue foram então adicionadas dos padrões analíticos de interesse nos valores de *cut-off* para ensaios de triagem para cabelo. Os resultados são apresentados na **tabela 15**.

Tabela 15: Resultados obtidos por imunoensaio de amostras de sangue total adicionadas dos padrões analíticos de interesse nos valores de *cut-off* para triagem.

Amostras Adicionadas	Resultados – em sinal							
	ANF	META	MDMA	BARB	BENZ	COC	OPI	THC
Branco	13	33	16	13	1	8	7	7
Anfetamina	175	13	9	3	1	6	2	5
Metanfetamina	15	107	23	16	1	23	15	7
MDMA	10	57	228	8	1	9	7	5
Fenobarbital	16	15	18	226	1	7	6	7
Pentobarbital	18	18	20	310	1	11	15	8
Diazepam	18	39	14	11	64	8	10	7
Oxazepam	16	33	13	9	115	8	11	7
Cocaína	40	52	44	18	2	216	22	6
Benzoilecgonina	11	18	14	5	1	216	7	6
Morfina	6	12	13	4	1	7	304	5
Codeína	14	26	19	6	1	7	597	8
THC	3	28	4	4	1	4	1	12

Legenda: ANF – ensaio para anfetamina; META – ensaio para metanfetamina; MDMA – ensaio para MDMA; BARB – ensaio para barbitúricos; COC – ensaio para cocaína; OPI – ensaio para opiáceos; THC – ensaio para Δ^9 -tetraidrocanabinol.

Na **tabela 15**, foi sinalizado de cor cinza os resultados da amostra “branco”, para todos os ensaios, assim como os resultados de cada amostra adicionada, para seu respectivo ensaio. Pode-se observar assim que as substâncias de interesse são detectadas e diferenciadas de amostras “branco” pelo imunoensaio em questão. Além disso, nenhum tipo de reatividade cruzada indesejada foi verificado frente aos demais resultados. A incapacidade de se detectar THC também foi observada.

Desta forma, pôde-se dizer que o *kit* preencheu alguns dos requisitos básicos para métodos de imunoensaio para triagem de amostras de cabelo como a detecção tanto das substâncias de interesse e seus produtos de biotransformação quanto dos valores de *cut-off* pré-estabelecidos (SPIEHLER, 2000; COOPER; KRONSTRAND; KINTZ, 2012).

9.2 Avaliação dos métodos de extração e os efeitos matriz

A partir de então iniciou-se as análises de triagem em amostras de cabelo. Em um primeiro instante foi proposto que a avaliação dos métodos de extração e sua aplicação no RANDOX ocorresse de grupo a grupo de substâncias, de acordo com as características físico-químicas de cada classe de compostos.

Sendo assim, os primeiros ensaios foram realizados começando pela classe das anfetaminas, segundo método já descrito na **tabela 13** por Pantaleão, Paranhos e Yonamine (2012) o qual compreende digestão alcalina e *clean up* das amostras por LPME. As amostras, em triplicata, foram adicionadas dos analitos de interesse separadamente nas concentrações de *cut-off*. A **tabela 16** apresenta a média dos resultados preliminares encontrados.

Tabela 16: Média dos resultados, em triplicata, do imunoensaio para detecção de anfetaminas em amostras de cabelo adicionadas na concentração de *cut-off*.

Amostras Adicionadas	Média de resultados – em sinal		
	AMPH	META	MDMA
Branco	118	128	32
Anfetamina	298	152	28
Metanfetamina	126	391	35
MDMA	150	298	271

Através dos primeiros resultados, pôde ser observado que as amostras denominadas “branco” (amostra referência negativa) apresentaram resposta aos testes realizados, o que sugere um efeito matriz derivado do método de digestão utilizado (NaOH). Entretanto vale ressaltar que mesmo com o efeito matriz foi possível se diferenciar as amostras “branco” das amostras supostamente positivas de maneira significativa.

A quantidade de cabelo utilizada para se aplicar no imunoensaio, foi inicialmente baseada no LOD do método, assim quanto mais cabelo, mais analito e mais fácil seria a diferenciação entre as amostras. Entretanto, ao se observar o efeito desta matriz sobre os resultados, outras quantidades de cabelo foram avaliadas. Desta forma, foram realizadas, em triplicata, análises de amostras “zero” (sem cabelo), amostras de 10 mg

e amostras de 25 mg. O mesmo procedimento para as anfetaminas foi então repetido, entretanto sem a adição de padrões analíticos. O **gráfico 1** apresenta os resultados encontrados, sendo cada ponto a representação do valor de cada replicata e a barra sua dispersão.

Gráfico 1: Avaliação do efeito matriz a partir da análise por digestão alcalina seguida de LPME para amostras zero, amostras de 10 mg e amostra de 25 mg.

Ao observar o gráfico, foi possível notar que o efeito matriz só aumentou com 25 mg de amostra para os ensaios de anfetamina. Para os ensaios de metanfetamina e MDMA o “ruído” da matriz foi praticamente o mesmo seja para 10 mg ou 25 mg. Isto pode ser um indicativo de que este efeito é mais relacionado com a presença da matriz em si do que com a sua quantidade. Desta forma, o emprego das alíquotas de 25 mg foi mantido, pois se o efeito da matriz é o mesmo indiferente da quantidade de amostra, pelo menos uma maior quantidade de analitos estará presente, permitindo a diferenciação entre amostras positivas e negativas.

Testes preliminares também foram realizados para cocaína e morfina, visto que muitos trabalhos fazem a análise dessas classes de substância de maneira simultânea devido as suas semelhanças físico-químicas (MONTAGNA et al., 2002; ROMOLO et al., 2003; GOUVEIA et al., 2008; MIGUEZ-FRAMIL et al., 2013) Sendo assim, amostras negativas foram adicionadas dos analitos de interesse na concentração do *cut-off* e seguiu-se o método de extração já descrito na **tabela 5** proposto por Cooper et al. (2005), Di Corcia et al. (2012) e Salomone et al. (2012) que implica em incubação das amostras com metanol, visto que estes compostos podem ser facilmente degradados em condições alcalinas (BACIU et al., 2015). A média dos resultados obtidos estão apresentados na **tabela 17**.

Tabela 17: Média dos resultados do imunoensaio para detecção de cocaína e morfina em amostras de cabelo adicionadas na concentração de *cut-off*.

Amostras Adicionadas	Média de resultados	
	COC	OPI
Branco	54	0
Cocaína	248	0
Morfina	35	648

Para a análise de opiáceos os resultados obtidos corresponderam ao esperado, não apresentando qualquer efeito matriz devido ao método de extração utilizado. Já os resultados para cocaína apresentaram influência da matriz, entretanto muito abaixo dos valores apresentados para as amostras adicionadas de cocaína, sendo possível diferenciá-los.

Apesar dos testes preliminares terem apresentado resultados satisfatórios, a busca por métodos que contemplem a detecção do maior número de substâncias possíveis de uma única vez, principalmente para imunoensaio, é altamente requerida, não sendo viável a avaliação dos ensaios por cada classe de substâncias, mais sim através de um método universal. A avaliação dos métodos de extração também apresenta uma falha por não simular verdadeiramente a extração dos analitos de interesse uma vez que estes são adicionados às amostras e não incorporados na matriz.

Diante destas dificuldades, um novo plano de estudo foi traçado em vista de se atingir melhores resultados. Foi então que a produção das amostras artificiais ganhou atenção e foi introduzida ao trabalho. O objetivo, como já mencionado, foi de avaliar os métodos de extração propostos, levando em consideração tanto a sua capacidade de extrair o maior número de analitos de uma única vez, quanto a produção do efeito matriz.

Entre os procedimentos de extração reportados pela literatura os mais comumente empregados para ensaios imunoenzimáticos são os métodos de incubação por solução tampão (AGIUS; NADULSKI, 2015; COULTER et al., 2010; BAUMGARTNER et al., 2012) ou por metanol (PUJOL et al., 2007; POON et al., 2014). As soluções tampão infelizmente não puderam ser avaliadas neste trabalho devido a limitações do próprio *kit*. As amostras após o período de incubação devem passar por

uma etapa de evaporação antes de serem submetidas ao imunoensaio. Isto se deve a necessidade de ressuspender os extratos com solução tampão do próprio *kit* em um volume exato de 65 μ L. Desta forma, a prática inviabilizou a utilização de soluções aquosas como meios extratores devido ao tempo demandado para este processo. Outro cuidado levado em consideração foi o comportamento volátil das anfetaminas, não sendo recomendado uso de altas temperatura para tal processo, o que dificultaria ainda mais a evaporação das soluções tampão (COULTER et al., 2010).

Sendo assim, o método escolhido para se avaliar a aplicabilidade do imunoensaio foi a tradicional incubação por metanol. Entretanto, além do metanol, outro solvente também foi avaliado, a acetonitrila, devido aos bons resultados de extração reportados por Lendoiro et al. (2012), além da secagem rápida.

Partindo deste ponto iniciou-se os ensaios. O primeiro requisito avaliado foi a capacidade de extração dos dois solventes. Para isso foram analisadas, em quintuplicata, amostras “branco” (cabelo referência negativo), controles (amostras de cabelo adicionadas no valor do *cut-off*) e as amostras artificiais já confirmadas.

Os resultados encontrados são apresentados pelos **gráficos 2 e 3**. Os gráficos foram elaborados utilizando a ferramenta *Box Plot*, onde as barras representam a frequência de 50% dos valores encontrados e os traços os valores máximo, mediana e mínimo.

Gráfico 2: Resultados da capacidade de extração dos analitos por acetonitrila em amostras artificiais.

Gráfico 3: Resultados da capacidade de extração dos analitos por metanol em amostras artificiais.

□ Branco □ Controle □ Amostra Artificial

Através do gráfico de barras pôde-se observar de maneira esquemática e facilitada o sinal gerado pelo imunoensaio entre as diferentes amostras analisadas. Para os ensaios com acetonitrila, o mesmo não apresentou capacidade de extração para as amostras artificiais que continham anfetamina, metanfetamina, MDMA, fenobarbital e morfina, visto que o sinal emitido por essas amostras foi menor que o sinal emitido pelos controles. Já para as amostras que continham diazepam e cocaína, o sinal emitido foi igual ao sinal dos controles, sendo assim satisfatório. O método de extração proposto por Lendoiro et al. (2012), foi desenvolvido e aplicado a técnica de LC-MS/MS, o que justifica os resultados encontrados quando comparada a sua sensibilidade com a dos imunoensaios.

Já os resultados emitidos para os ensaios com metanol foram diferentes. Todas as amostras artificiais, com exceção da amostra de diazepam, apresentaram resultado positivo quando comparada com os resultados dos controles. Entretanto os resultados tanto para metanfetamina quanto para MDMA não foram satisfatórios visto que os controles apresentaram valores muito discrepantes, não permitindo uma boa diferenciação das amostras branco. Para os benzodiazepínicos ocorreu outro problema. O efeito matriz gerado pelo emprego do metanol foi tão alto que o mesmo sinal foi obtido para os 3 grupos de amostras, não sendo possível diferencia-las.

Embora ambos os métodos de extração tenham apresentado problemas, a incubação por metanol foi capaz de extrair todos analitos incorporados nas amostras artificiais, mostrando-se mais uma vez como um ótimo extrator universal. Por esta razão, os demais ensaios foram realizados somente a partir da incubação com metanol.

Sendo assim, o seguinte quesito avaliado foi a interferência da matriz e a reatividade cruzada do imunoensaio. Para este ensaio foram analisadas, em quintuplicada, amostras “branco” e os controles para todas as classes de drogas. Os gráficos foram elaborados utilizando a ferramenta *Box Plot*, onde as barras representam a frequência de 50% dos valores encontrados e os traços os valores máximo, mediana e mínimo.

Os **gráficos 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10** representam os resultados encontrados. Cada gráfico representa uma amostra controle de cada analito. A ideia foi observar se existia alguma interferência da matriz quando este controle era comparado com uma amostra branco (ensaio “BCO”) e se existia alguma reatividade cruzada os outros testes, quando este era comparado aos demais controles (em seus respectivos ensaios).

Gráfico 4: Comparação entre a resposta de amostras controle de anfetamina e as amostras controle para as demais drogas, em seus respectivos ensaios.

Gráfico 5: Comparação entre a resposta de amostras controle de metanfetamina e as amostras controle para as demais drogas, em seus respectivos ensaios.

Gráfico 6: Comparação entre a resposta de amostras controle de MDMA e as amostras controle para as demais drogas, em seus respectivos ensaios.

Gráfico 7: Comparação entre a resposta de amostras controle de barbitúrico e as amostras controle para as demais drogas, em seus respectivos ensaios.

Gráfico 8: Comparação entre a resposta de amostras controle de benzodiazepínico e as amostras controle para as demais drogas, em seus respectivos ensaios.

Gráfico 9: Comparação entre a resposta de amostras controle de cocaína e as amostras controle para as demais drogas, em seus respectivos ensaios.

Gráfico 10: Comparação entre a resposta de amostras controle de opiáceos e as amostras controle para as demais drogas, em seus respectivos ensaios.

Como já mencionado anteriormente, e também visualizado nos gráficos acima, o ensaio para benzodiazepínicos não é apropriado para a adaptação proposta pelo trabalho. Todas as amostras submetidas ao imunoensaio, amostras “branco”, controles e amostras artificiais, por incubação com metanol, apresentaram o mesmo resultado, não havendo diferenciação entre elas. Isto se deve provavelmente ao efeito da matriz sobre o imunoensaio.

Para as anfetaminas, os resultados foram diferentes. Observando o **gráfico 4** nota-se que foi possível a diferenciação entre a resposta do controle de anfetamina com a amostra “branco”. Além disso, os controles de anfetamina não interferiram nos ensaios para barbitúrico e para opiáceos, o que não ocorreu para os ensaios de metanfetamina, MDMA e cocaína. Para estes 3 ensaios as anfetaminas apresentaram um sinal significativo, o que poderia ser considerado um “falso-positivo”.

Os resultados para metanfetamina e MDMA foram muito semelhantes. Ambos não apresentaram boa diferenciação entre suas amostras “branco” e seus controles devido não somente pelo alto sinal emitido pelas amostras “branco”, mas também pela grande variação dos resultados dos controles o que pode ser visualizado no **gráfico 5** e **6** pela altura das barras, prejudicando ainda mais essa importante diferenciação. Seus controles já não interferiram nos ensaios para anfetamina, barbitúricos e opiáceos, porém interferiram nos resultados entre eles mesmo e com cocaína.

Para a classe dos barbitúricos pôde-se observar pelo **gráfico 7** a boa diferenciação entre seus controles e as amostras “branco” e a não interferência para os ensaios de anfetamina, metanfetamina, MDMA e opiáceos. Entretanto o mesmo não se pode dizer para o ensaio de cocaína, que mais uma vez não foi apropriado pelo alto sinal emitido. Quando então avaliamos **gráfico 8** percebemos que o controle de cocaína em si não interfere nos demais ensaios, entretanto não consegue ter boa diferenciação entre uma amostra “branco”, o que inviabiliza o ensaio como um todo.

Por fim, observando o **gráfico 10** é notável a boa diferenciação entre a resposta do controle de opiáceo com a amostra “branco”. Mais do que isso, os controles de opiáceo não interferiram nos ensaios para anfetamina e para barbitúrico, porém o mesmo não ocorreu para os ensaios de metanfetamina, MDMA e cocaína.

Sumarizando os resultados é possível notar que existe uma certa uniformidade entre os dados. A classe das anfetaminas, barbitúricos e opiáceos apresentaram tanto uma boa diferenciação entre seus controles e as amostras “branco”, quanto a falta de interferência significativa entre os seus próprios ensaios. Já a metanfetamina, o MDMA

e os benzodiazepínicos apresentaram nos ensaios sinais muito elevados como resposta fazendo com que a diferenciação entre eles e os demais ficasse prejudicada. E para os ensaios com cocaína, todas amostras avaliadas apresentaram resultado “falso-positivo”, podendo se supor uma contaminação proveniente do próprio laboratório. A **figura 14** representa de maneira visual a interpretação final dos resultados encontrados, no qual as cores verde e vermelha representam a adequação (verde) ou não (vermelho) da resposta obtida.

Figura 14: Representação da interpretação final dos resultados encontrados para os ensaios de reatividade cruzada e interferência da matriz.

Controles <i>Cut-off</i>	Ensaio						
	ANF	META	MDMA	BARB	BENZ	COCA	OPI
ANF	P	?	?	N	?	?	N
META	N	?	?	N	?	?	N
MDMA	N	?	?	N	?	?	N
BARB	N	N	N	P	?	?	N
BENZ	N	?	N	N	?	?	N
COCA	N	?	?	N	?	?	N
OPI	N	?	?	N	?	?	P

Legenda: P: resultado considerado positivo; N: resultado considerado negativo; ?: resultados duvidoso devido à interferência da matriz.

Pode se dizer assim que o grande problema do método proposto é o elevado efeito matriz para alguns dos ensaios avaliados. Embora o método de imunoensaio seja do tipo heterogêneo, sua etapa de lavagem não foi suficiente para se retirar os todos os interferentes da matriz. Uma alternativa para esta problemática seria o aumento no número de lavagens ou então a substituição do tipo de ensaio para tipo *Sandwich*. Os imunoensaios do tipo *sandwich* também são imunoensaios do tipo heterogêneo, porém compreendem uma etapa a mais de lavagem, sendo o conjugado adicionado somente após a primeira delas (SPIEHLER et al., 1999; COULTER et al., 2010; FLANAGAN et al., 2007).

Outra alternativa seria a alteração do solvente extrator. Como o problema não foi a extração dos analitos em si, soluções extratoras mais forte conteúdo ácidos, como HCl ou ácido trifluoracético - TFA, não seriam as mais recomendadas frente a possibilidade de se degradar mais ainda a matriz (SEGURA et al., 1999). A digestão

enzimática também não poderia se apresentar como uma opção pois, sob certas condições, poderia desnaturar os anticorpos utilizados nos imunoensaios (VOGLIARDI et al., 2015). Desta forma uma opção mais palpável seria avaliar a possibilidade de se utilizar a mistura entre os solventes metanol e acetonitrila, sendo esta mistura de solventes já reportada por diversos autores (FAVRETTO et al., 2011; BROECKER et al., 2012; MONTESANO et al., 2014). Infelizmente essa alternativa não foi avaliada no presente trabalho devido a alguns fatores limitantes como, tempo, fatores econômicos e quantidade de amostras artificiais para teste.

Outra maneira de se avaliar os resultados obtidos é através de parâmetros como sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e exatidão, sendo estes seguidos por alguns autores (GRÖNHOLM; LILLSUNDE, 2001; FERRARA et al., 1998; BAUMGARTNER et al., 2012; HAN et al., 2006; LACHENMEIER; MUSSHOFF; MADEA, 2006; PUJOL et al., 2007; COULTER et al., 2010). Como descrito na metodologia, estes parâmetros são avaliados através da análise das amostras reais. Para isso foram avaliadas 20 amostras negativas, 7 positivas para cocaína, 2 para fenobarbital e 1 para codeína, previamente confirmadas. Os resultados encontrados estão dispostos **tabela 18**.

Tabela 18: Resultados para os ensaios de sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) e exatidão (EX).

Ensaios	N	VN	VP	FN	FP	S	E	VPP	VPN	EX
Cocaína	27	14	5	2	6	71	70	45	87	70
Barbitúrico	22	20	2	0	0	100	100	100	100	100
Opiáceo	21	20	0	1	0	0	100	0	95	95

Legenda: N (número de amostras); VN (verdadeiro negativo); VP (verdadeiro positivo); FN (falso negativo) e FP (falso positivo).

Embora não haja um critério estabelecido, alguns autores sugerem que os parâmetros citados não devam apresentar resultados abaixo de 90% (SPIEHLER, 1999; LACHENMEIER; MUSSHOFF; MADEA, 2006; MUSSHOFF et al., 2012). O ensaio para barbitúricos apresentou excelentes resultados atingindo valores de 100%. Bons resultados também foram encontrados para o ensaio de opiáceo em relação aos parâmetros de especificidade, valor preditivo negativo e exatidão, entretanto o método não apresentou sensibilidade e valor preditivo positivo adequado. Este fato está

relacionado ao fato da única amostra positiva ter apresentado resultado falso-negativo. Já o ensaio de cocaína apresentou uma faixa de resultados por volta de 70%, ficando abaixo do ideal, o que foi caracterizado principalmente pelo alto número de amostras falso-positivas, o que fortalece ainda mais a ideia de que exista um problema contaminação para este analito.

Os resultados apresentados, embora de certa forma satisfatórios, não representam a realidade analítica do *kit*. Isto porque o número de amostras reais empregado para se calcular os parâmetros necessários é muito abaixo do ideal, sem mencionar a falta de amostras para as demais classes de drogas. Alguns autores reportam o emprego de milhares de amostras para se obter resultados mais confiáveis (AGIUS; NADULSKI, 2015; POON et al., 2014). A escassez de amostras reais já foi discutida neste trabalho e foi apontada como ponto crítico por outros autores, relatando não só a dificuldade em se obter amostras reais, mas sim amostras reais positivas (BAUMGARTNER et al., 2012).

Os guias de validação analítica sugerem, além dos ensaios sensibilidade, especificidade e exatidão, ensaios de LOD e precisão para avaliação dos resultados. Os LODs já foram apresentados na **tabela 14** sendo estes fornecidos pelos fabricantes do *kit*. Já os ensaios de precisão não foram satisfatórios quando realizados, apresentando $CV\% > 20\%$. Mesmo sugerido, muitos autores não realizam este tipo de ensaio para validação dos seus métodos imunoenzimáticos (BAUMGARTNER et al., 2012; MUSSHOF et al., 2012; POON et al., 2014).

10 CONCLUSÃO

A validação e aplicação do método de imunoensaio para determinação de anfetaminas, benzodiazepínicos, barbitúricos, opiáceos, cocaína e canabinóides a partir da adaptação de *kit* para imunoensaio DOA I WB P em sangue com a tecnologia Biochip - Randox Laboratórios® para amostras de cabelo não foi possível devido a alguns fatores: o primeiro fator foi o elevado efeito de matriz apresentado pelo *kit*, fazendo com o método não preenchesse um dos requisitos básicos para métodos de imunoensaio para triagem de amostras de cabelo. O segundo foi a falta de amostras reais positivas o que impossibilitou a validação de alguns parâmetros como sensibilidade, especificidade e exatidão do método

Apesar disso, os ensaios direcionados para as anfetaminas, barbitúricos e opiáceos apresentaram resultados satisfatórios durante as etapas de desenvolvimento do método, sendo novos ensaios promissores para estas classes de drogas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDALLA, R.R. et al. Prevalence of cocaine use in Brazil: data from the II Brazilian National Alcohol and Drugs Survey (BNADS). **Addictive Behaviors**, v. 39, n. 1, p. 297–301, 2014.

AGIUS, R.; KINTZ, P. Drug and Alcohol Testing in Hair: Collection and Analysis. **European Workplace Drug Testing Society** v. 1, 2010.

AGIUS, R.; NADULSKI, T. Utility of ELISA screening for the monitoring of abstinence from illegal and legal drugs in hair and urine. **Drug Testing and Analysis**, v. 6, n. S1, p. 101-109, 2014.

ALEKSA, K. et al. Simultaneous detection of seventeen drugs of abuse and metabolites in hair using solid phase micro extraction (SPME) with GC/MS. **Forensic Science International**, v. 218, n. 1, p. 31-36, 2012.

ALMEIDA, A.M.; CASTEL-BRANCO, M.M.; FALCAO, A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. **Journal of Chromatography B**, v. 774, n. 2, p. 215-222, 2002.

AUWÄRTER, V. et al. Hair analysis for Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid A—New insights into the mechanism of drug incorporation of cannabinoids into hair. **Forensic Science International**, v. 196, n. 1, p. 10-13, 2010.

BACIU, T. et al. Recent trends in analytical methods and separation techniques for drugs of abuse in hair. **Analytica Chimica Acta**, v. 856, p. 1-26, 2015.

BALIKOVA, M. Hair analysis for drug abuse. Plausibility of interpretation. **Biomedical Papers-Palacky University in Olomouc**, v. 149, n. 2, p. 199, 2005.

BARROSO, M. et al. Development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of cocaine and its main metabolite, benzoylecgonine, in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, n. 20, p. 3320-3326, 2008.

BAUMGARTNER, A.M. et al. Radioimmunoassay of hair for determining opiate-abuse histories. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 20, n. 7, p. 748-752, 1979.

BAUMGARTNER, A.M.; BLACK, C.T.; JONES, P.F. Detection of phencyclidine in hair. **Journal of Forensic Sciences**, v. 26, n. 3, p. 576-581, 1981.

BAUMGARTNER, M.R. et al. Analysis of drugs of abuse in hair: evaluation of the immunochemical method VMA-T vs. LC-MS/MS or GC-MS. **Forensic Science International**, v. 215, p. 56-59, 2012.

BAUMGARTNER, W.A. et al. Radioimmunoassay of cocaine in hair: concise communication. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 23, n. 9, p. 790-792, 1982.

BERMEJO, A.M. et al. Solid-phase microextraction for the determination of cocaine and cocaethylene in human hair by gas chromatography–mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 156, n. 1, p. 2-8, 2006.

BERNARDES, S.S.; TURINI, C.A.; MATSUO, T. Perfil das tentativas de suicídio por sobredose intencional de medicamentos atendidas por um Centro de Controle de Intoxicações do Paraná, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 26, n. 7, p. 1366-1372, 2010.

BONILHA, L. et al. Antiepileptic drugs: a study of 1028 cases registered by the Sao Paulo Intoxication Control Center. **Seizure**, v. 14, n.3, p. 170-174, 2005.

BOUMBA, V.A.; ZIAVROU, K.S. VOUGIOUKLAKIS, T. Hair as a biological indicator of drug use, drug abuse or chronic exposure to environmental toxicants. **International Journal of Toxicology**, v. 25, n. 3, p. 143-163, 2006.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim de Farmacoepidemiologia do Sistema Nacional de Gerenciamento de Produtos Controlados - SNGPC**. v.2, n.1, 2011.

BRASIL. Lei nº 13.103, de 2 de março de 2015. Dispõe sobre o exercício da profissão de motorista. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF – 3 mar. 2015. 1, p. 1.

BROECKER, S.; HERRE, S.; PRAGST, F. General unknown screening in hair by liquid chromatography–hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC–QTOF-MS). **Forensic Science International**, v. 218, n. 1, p. 68-81, 2012.

CAIRNS, T. et al. Removing and identifying drug contamination in the analysis of human hair. **Forensic Science International**, v. 145, n. 2, p. 97-108, 2004.

CALDAS, S.S. et al. Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604-1617, 2011.

CAPLAN, Y.H.; GOLDBERGER, B.A. Alternative specimens for workplace drug testing. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 25, n. 5, p. 396-399, 2001.

CASSANI, M.; SPIEHLER, V. Analytical requirements, perspectives and limits of immunological methods for drugs in hair. **Forensic Science International**, v. 63, n. 1, p. 175-184, 1993.

CBHSQ. Center for Behavioral Health Statistics and Quality. **Behavioral Health Trends in the United States: Results from the 2014 National Survey on Drug Use and Health**. United States: Rockville, 2015

CESARE, D. Exame toxicológico em caminhoneiros volta a ser obrigatório em SP. **Folha de São Paulo**, São Paulo, 20 jul. 2016. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2016/07/1793802-exame-toxicologico-em-caminhoneiros-volta-a-ser-obrigatorio-em-sp.shtml>>. Acesso em: 23 nov. 2016.

CHÈZE, M. et al. Simultaneous analysis of six amphetamines and analogues in hair, blood and urine by LC-ESI-MS/MS: application to the determination of MDMA after low Ecstasy intake. **Forensic Science International**, v. 170, n. 2, p. 100-104, 2007.

CHÈZE, M.; VILLAIN, M.; PÉPIN, G. Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC-MS/MS: Application to forensic cases of drug facilitated crimes. **Forensic Science International**, v. 145, n. 2, p. 123-130, 2004.

CIRIMELE, V. Amphetamine Determination in Hair. In: KINTZ, P. (Ed.). **Analytical and practical aspects of drug testing in hair**. United States: CRC Press, 2007. cap 6, p. 143-162.

COGNARD, E. et al. Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI/MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 826, n. 1, p. 17-25, 2005.

CONE, E.J. Legal, workplace, and treatment drug testing with alternate biological matrices on a global scale. **Forensic Science International**, v. 121, n. 1, p. 7-15, 2001.

COOPER, G.A.A. et al. Comparison of Cozart® microplate ELISA and GC-MS detection of methadone and metabolites in human hair. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 29, n. 7, p. 678-681, 2005.

COOPER, G.A.A. Hair testing is taking root. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 48, n. 6, p.516-530, 2011.

COOPER, G.A.A.; KRONSTRAND, R.; KINTZ, P. Society of Hair Testing guidelines for drug testing in hair. **Forensic Science International**, v. 218, n. 1, p. 20-24, 2012.

CORDERO, R.; PATERSON, S. Simultaneous quantification of opiates, amphetamines, cocaine and metabolites and diazepam and metabolite in a single hair sample using GC–MS. **Journal of Chromatography B**, v. 850, n. 1, p. 423-431, 2007.

COULTER, C. et al. Semi-quantitative analysis of drugs of abuse, including tetrahydrocannabinol in hair using aqueous extraction and immunoassay. **Forensic Science International**, v. 196, n. 1, p. 70-73, 2010.

CURTIS, J.; GREENBERG, M. Screening for drugs of abuse: Hair as an alternative matrix: a review for the medical toxicologist. **Clinical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 22-34, 2008.

DE AQUINO NETO, F.R.; MARQUES, M.A.S.; PEREIRA, H.M.G. Controle de dopagem no esporte: aspectos químicos e farmacológicos que afetam a detecção de drogas no cabelo. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 3, 2002.

DEGENHARDT, L., et al. Global burden of disease attributable to illicit drug use and dependence: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. **The Lancet**, v. 382, n. 9904, p. 1564-1574, 2013.

DI CORCIA, D. et al. Simultaneous determination in hair of multiclass drugs of abuse (including THC) by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 899, p. 154-159, 2012.

DIEHL, A.; CORDEIRO, D. C.; LARANJEIRA, R. **Dependência química: prevenção, tratamento e políticas públicas**. Artmed, 2011.

ELLER, S.C.W.S. **Estudo da incerteza de medição em análises toxicológicas de substâncias psicoativas em urina**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2014.

FAVRETTO, D. et al. High performance liquid chromatography–high resolution mass spectrometry and micropulverized extraction for the quantification of amphetamines, cocaine, opioids, benzodiazepines, antidepressants and hallucinogens in 2.5 mg hair samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 38, p. 6583-6595, 2011.

FERNÁNDEZ, M.M.R. et al. A quantitative, selective and fast ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 33 basic drugs in hair (amphetamines, cocaine, opiates, opioids and metabolites). **Journal of Chromatography B**, v. 965, p. 7-18, 2014.

FERRARA, D. S. et al. Quality control in toxicological analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 713 n. 1, p. 227-243, 1998.

FERRARI, A. et al. Hair analysis to monitor abuse of analgesic combinations containing butalbital and propyphenazone. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 115, p. 576-579, 2015.

FERREIRA, P.E.M.; MARTINIB, R.K. Cocaína: lendas, história e abuso. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 23, n. 2, p. 96-9, 2001.

FLANAGAN R.J. et al. **Fundamentals of Analytical Toxicology**. England: John Wiley & Sons, Ltd, 2007. cap 12, p. 309-334.

FRISON, G. et al. Detection of thiopental and pentobarbital in head and pubic hair in a case of drug-facilitated sexual assault. **Forensic Science International**, v. 133, n. 1, p. 171-174, 2003.

GAILLARD, Y.; PÉPIN, G. Screening and identification of drugs in human hair by high-performance liquid chromatography photodiode array UV detection and gas chromatography mass spectrometry after solid-phase extraction a powerful tool in forensic medicine. **Journal of Chromatography**, v. 762, n. 1, p. 251-267, 1997.

GAMBELUNGHE, C. et al. Hair analysis by GC-MS/MS to verify abuse of drugs. **Journal of Applied Toxicology**, v. 25, n. 3, p. 205-211, 2005.

GAMBELUNGHE, C. et al. Norcocaine and cocaethylene distribution patterns in hair samples from light, moderate, and heavy cocaine users. **Drug Testing and Analysis**, 2015.

GOULLE, J.P. et al. Phenobarbital in hair and drug monitoring. **Forensic Science International**, v. 70, n. 1, p. 191-202, 1995.

GOUVEIA, C. A. et al. Simultaneous quantification of morphine and cocaine in hair samples from drug addicts by GC-EI/MS. **Biomedical Chromatography**, v. 26, n. 8, p. 1041-1047, 2012.

GRÖNHOLM, M.; LILLSUNDE, P. A comparison between on-site immunoassay drug-testing devices and laboratory results. **Forensic Science International**, v. 121, n. 1, p. 37-46, 2001.

HALL, B.J.; PARIKH, A.R.; BRODBELT, J.S. Aqueous phase hexylchloroformate derivatization and solid phase microextraction: determination of benzoylecgonine in urine by gas chromatography-quadrupole ion trap mass spectrometry. **Journal of Forensic Sciences**, v. 44, n. 3, p. 527-534, 1999.

HAN, E. et al. Validation of the Immulysis® Microplate ELISA for the Detection of Methamphetamine in Hair. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 30, n. 6, p. 380-385, 2006.

HARKEY, M. R. Anatomy and physiology of hair. **Forensic Science International**, v. 63, n. 1, p. 9-18, 1993.

HENDERSON, G. L. Mechanisms of drug incorporation into hair. **Forensic Science International**, v. 63, n. 1, p. 19-29, 1993.

HUŠEK, Petr. Derivatization and gas chromatographic determination of hydroxycarboxylic acids treated with chloroformates. **Journal of Chromatography A**, v. 547, p. 307-314, 1991.

IMBERT, L. et al. Development and validation of a single LC–MS/MS assay following SPE for simultaneous hair analysis of amphetamines, opiates, cocaine and metabolites. **Forensic Science International**, v. 234, p. 132-138, 2014.

INPAD. Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Políticas Públicas do Álcool e Outras Drogas. **Segundo Levantamento Nacional de Álcool e Drogas - 2012** (II LENAD - 2012). São Paulo: UNIFESP, 2014.

JARDIM, I.C.S.F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, p. 13-25, 2010.

KARSCHNER, E.L. et al. Implications of plasma $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol, 11-hydroxy-THC, and 11-nor-9-carboxy-THC concentrations in chronic cannabis smokers. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 33, n. 8, p. 469-477, 2009.

KIDWELL, D.A.; SMITH, F.P. Passive Exposure, Decontamination Procedures, Cutoffs, and Bias: Pitfalls in the Interpretation of Hair Analysis Results for Cocaine Use. In: KINTZ, P. (Ed.). **Analytical and practical aspects of drug testing in hair**. United States: CRC Press, 2007. cap 2, p. 25-72.

KIM, J.Y.; IN, M.K. Determination of 11-nor- $\Delta 9$ -tetrahydrocannabinol-9-carboxylic acid in hair using gas chromatography / tandem mass spectrometry in negative ion chemical ionization mode. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 7, p. 1339-1342, 2007.

KINTZ, P. Value of hair analysis in postmortem toxicology. **Forensic Science International**, v. 142, n. 2, p. 127-134, 2004.

KOREN, G.; et al. Hair analysis of cocaine: differentiation between systemic exposure and external contamination. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 32, n. 7, p. 671-675, 1992.

KRONSTRAND, R. et al. Hair analysis for drugs in driver's license regranting. A Swedish pilot study. **Forensic Science International**, v. 196, n. 1, p. 55-58, 2010.

KRONSTRAND, R. et al. Screening for drugs of abuse in hair with ion spray LC–MS–MS. **Forensic Science International**, v. 145, n. 2, p. 183-190, 2004.

KRONSTRAND, R.; SCOTT, K. Drug Incorporation into Hair. In: KINTZ, P. (Ed.). **Analytical and practical aspects of drug testing in hair**. United States: CRC Press, 2007. cap 1, p. 1 -24.

LACHENMEIER, K.; MUSSHOF, F.; MADEA, B. Determination of opiates and cocaine in hair using automated enzyme immunoassay screening methodologies followed by gas chromatographic–mass spectrometric (GC–MS) confirmation. **Forensic Science International**, v. 159, n. 2, p. 189-199, 2006.

LENDIRO, E. et al. Target screening and confirmation of 35 licit and illicit drugs and metabolites in hair by LC–MS/MS. **Forensic Science International**, v. 217, n. 1, p. 207-215, 2012.

LEVINE, B. (Ed.). **Principles of Forensic Toxicology**. 2nd ed. Washington, DC: AACC, 2003.

LEYTON, V. et al. Hair drug testing in the new Brazilian regulation to obtain professional driver's licence: no parallel to any other law enforcement in the world. **Addiction**, v. 110, n. 7, p. 1207-1208, 2015.

LÓPEZ-GUARNIDO, O. et al. Hair testing for cocaine and metabolites by GC/MS: criteria to quantitatively assess cocaine use. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 8, p. 838-844, 2013.

MAUBLANC, J. et al. Identification and quantification of 35 psychotropic drugs and metabolites in hair by LC-MS/MS: application in forensic toxicology. *International Journal of Legal Medicine*, p. 1-10, 2014.

MENCK, R.A. et al. Hollow-fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry of barbiturates in whole blood samples. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 23, p. 3361-3368, 2012.

MEROLA, G. et al. Determination of different recreational drugs in hair by HS-SPME and GC/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 7, p. 2987-2995, 2010.

MÍGUEZ-FRAMIL, M. et al. Matrix solid phase dispersion assisted enzymatic hydrolysis as a novel approach for cocaine and opiates isolation from human hair. **Journal of Chromatography A**, v. 1316, p. 15-22, 2013.

MILLER, E.I.; WYLIE, F.M.; OLIVER, J.S. Detection of benzodiazepines in hair using ELISA and LC-ESI-MS-MS. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 30, n. 7, p. 441-448, 2006.

MILLER, E.I.; WYLIE, F.M.; OLIVER, J.S. Simultaneous detection and quantification of amphetamines, diazepam and its metabolites, cocaine and its metabolites, and opiates in hair by LC-ESI-MS-MS using a single extraction method. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 32, n. 7, p. 457-469, 2008.

MOFFAT, A.C. et al. **Clarke's analysis of drugs and poisons** - volume I 4th ed. London, UK: Pharmaceutical Press, 2011.

MOLLER, M. et al. Solid-phase microextraction for the detection of codeine, morphine and 6-monoacetylmorphine in human hair by gas chromatography–mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 196, n. 1, p. 64-69, 2010.

MONTAGNA, M. et al. Hair analysis for opiates, cocaine and metabolites: Evaluation of a method by Interlaboratory comparison. **Forensic Science International**, v. 128, n. 1, p. 79-83, 2002.

MONTESANO, C.; JOHANSEN, S. S.; NIELSEN, M.K.K. Validation of a method for the targeted analysis of 96 drugs in hair by UPLC–MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 88, p. 295-306, 2014.

MUSSHOFF, F. et al. Cocaine and opiate concentrations in hair from subjects in a heroin maintenance program in comparison to a methadone substituted group. **International Journal of Legal Medicine**, v. 123, n. 5, p. 363-369, 2009.

MUSSHOFF, F. et al. Evaluation of two immunoassay procedures for drug testing in hair samples. **Forensic Science International**, v. 215, n. 1, p. 60-63, 2012.

MUSSHOFF, F.; MADEA, B. New trends in hair analysis and scientific demands on validation and technical notes. **Forensic Science International**, v. 165, n. 2, p. 204-215, 2007.

NAKAHARA, Y. Hair analysis for abused and therapeutic drugs. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 733, n. 1, p. 161-180, 1999.

NIEDBALA, R.S.; GONZALEZ, J.M. Immunoassays. In: MOFFAT, A.C.; OSSELTON, M.D.; WIDDOP, B. (Ed.). **Clarke's analysis of drugs and poisons - volume II 4th ed.** London, UK: Pharmaceutical Press, 2011. cap. 31. p. 496-506.

NIELSEN, M.K.K.; JOHANSEN, S.S.; LINNET, K. Pre-analytical and analytical variation of drug determination in segmented hair using ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 234, p. 16-21, 2014.

OLIVEIRA, C.D.R. et al. Recent advances in chromatographic methods to detect drugs of abuse in alternative biological matrices. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 3, n. 2, p. 95-109, 2007a.

OLIVEIRA, C.D.R.; YONAMINE, M.; MOREAU, R.L.M. Headspace solid-phase microextraction of cannabinoids in human head hair samples. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 128-134, 2007b.

OIT. Organização Internacional do Trabalho. **Dados sobre o uso de Álcool e outras drogas no trabalho, 2013.** Disponível em: <http://www.sesipr.org.br/cuide-se-mais/alcool-e-outras-drogas/dados-sobre-o-uso-de-alcool-e-outras-drogas-no-trabalho-1-23999-216358.shtml>> Acesso em 15 nov. 2016

OPAS. Organização Pan-americana de Saúde. Saúde nas Américas – Panorama Regional e Perfil de Países. **Publicação Científica e Técnica.** n. 636. Washington, 2012.

PANTALEÃO, L.N.; PARANHOS, B.A.P.B.; YONAMINE, M. Hollow-fiber liquid-phase microextraction of amphetamine-type stimulants in human hair samples. **Journal of Chromatography**, v. 1254, p. 1-7, 2012.

PANTALEÃO, L.N.; **Análise toxicológica de anfetaminas e benzodiazepínicos em amostras de cabelo por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.** São Paulo: Universidade de São Paulo, 2014.

PASSOS, E. H.; SOUZA, T. P. Redução de danos e saúde pública: construções alternativas à política global de “guerra às drogas”. **Revista Psicologia & Sociedade**, v. 23, n. 1, 2011.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K.E. Bioanalysis of drugs by liquid-phase microextraction coupled to separation techniques. **Journal of Chromatography B**, v. 817, n. 1, p. 3-12, 2005.

POON, S. et al. Norcocaine in human hair as a biomarker of heavy cocaine use in a high risk population. **Forensic Science International**, v. 241, p. 150-154, 2014.

PRAGST, F.; BALIKOVA, M.A. State of the art in hair analysis for detection of drug and alcohol abuse. **Clinica Chimica Acta**, v. 370, n. 1, p. 17-49, 2006.

PUJOL, M. et al. Evaluation of the IDS One-Step™ ELISA kits for the detection of illicit drugs in hair. **Forensic Science International**, v. 170, n. 2, p. 189-192, 2007.

RANDOX. **Evidence Investigator: Operator Manual**. United Kingdom, v. 2.1, 2009.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7th ed. London, UK: Elsevier, 2012.

ROBBINS, C.R.; **Chemical and Physical behavior of human hair**. Berlin, GER: Springer, 2012.

ROMANO, G. et al. Cocaine contamination in pubic hair: Analysis of the decontamination method. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, v. 4, n. 4, p. 129-136, 2014.

ROMOLO, F.S. et al. Optimized conditions for simultaneous determination of opiates, cocaine and benzoylecgonine in hair samples by GC–MS. **Forensic Science International**, v. 138, n. 1, p. 17-26, 2003.

ROVERI, F.L.; PARANHOS, B.A.P.B.; YONAMINE, M. Determination of phenobarbital in hair matrix by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS). **Forensic Science International**, v. 265, p. 75-80, 2016.

SACHS, H. Screening Strategies in Hair Analysis on Drugs. In: KINTZ, P. (Ed.). **Analytical and practical aspects of drug testing in hair**. United States: CRC Press, 2007. cap 8, p. 187-200.

SAISHO, K.; TANAKA, E.; NAKAHARA, Y. Hair analysis for pharmaceutical drugs. I. Effective extraction and determination of phenobarbital, phenytoin and their major metabolites in rat and human hair. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 1, p. 59-64, 2001.

SALOMONE, A. et al. Hair analysis of drugs involved in drug-facilitated sexual assault and detection of zolpidem in a suspected case. **International Journal of Legal Medicine**, v. 126, n. 3, p. 451-459, 2012.

SAMHSA. **Substance Abuse and Mental Health Services Administration**. Drug Abuse Warning Network: National Estimates of Drug-Related Emergency Department Visits. United States: 2011.

SBTOX. Sociedade Brasileira de Toxicologia. **Diretrizes para Análise de Substâncias Psicoativas em Cabelos e Pelos**. Disponível em: <<http://www.sbtox.org/single-post/2015/1/1/Diretrizes-para-an%C3%A1lise-de-cabelo-Consulta-P%C3%BAblica>> Acesso em 28 nov. 2015.

SEGURA, J. et al. Immunological screening of drugs of abuse and gas chromatographic–mass spectrometric confirmation of opiates and cocaine in hair. **Journal of Chromatography**, v. 724, n. 1, p. 9-21, 1999.

SHAH, I. et al. Hair-based rapid analyses for multiple drugs in forensics and doping: application of dynamic multiple reaction monitoring with LC-MS/MS. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 73, 2014.

SIGMA. Sigma-Aldrich Co. **Derivatization Reagents for Selective Response and Detection in Complex Matrices. United States**. 2011. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf>>. Acesso em 08 abr. 2015.

SKENDER, L. et al. Quantitative determination of amphetamines, cocaine, and opiates in human hair by gas chromatography/mass spectrometry. **Forensic Science International**, v. 125, n. 2, p. 120-126, 2002.

SPIEHLER, V. Hair analysis by immunological methods from the beginning to 2000. **Forensic Science International**, v. 107, n. 1, p. 249-259, 2000.

SWGTOX. **Scientific Working Group for Forensic Toxicology - Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology**. United States. 2013.

TASSONI, G. et al. Hair analysis in order to evaluate drug abuse in driver's license regranting procedures. **Forensic Science International**, v. 244, p. 16-19, 2014.

TOLEDO, F.C.P. et al. Determination of cocaine, benzoylecgonine and cocaethylene in human hair by solid-phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 798, p. 361-365, 2003.

TSAl, J.S.C. Immunoassay technologies for drugs-of-abuse testing. In: SMITH, F.P. (Ed.). **Handbook of Forensic Drug Analysis**. United States of America: Elsevier Academic Press, 2005. cap 2. p. 13-34.

TSANACLIS, L.; WICKS, J.F.C. Differentiation between drug use and environmental contamination when testing for drugs in hair. **Forensic Science International**, v. 176, n. 1, p. 19-22, 2008.

UHL, M. Determination of Cannabinoids in Human Hair. In: KINTZ, P. (Ed.). **Analytical and practical aspects of drug testing in hair**. United States: CRC Press, 2007. cap 5, p.127-142.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. **Guidance for the Validation of Analytical Methodology and Calibration of Equipment used for Testing of Illicit Drugs in Seized Materials and Biological Specimens**. United Nations: New York, 2009.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. **Global study on homicide**. Austria: Viena, 2013

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. **World Drug Report 2016**. United Nations Publications: New York, 2016a.

UNODC. United Nations Office on Drugs and Crime. **Drogas – prevenção no ambiente de trabalho**. Disponível em: <https://www.unodc.org/documents/lpo-brazil/Topics_drugs/Publicacoes/UNODC_folder_trabalho.pdf>. Acesso em 24 nov. 2016b.

VILLAIN, M.; CIRIMELE, V.; KINTZ, P. Hair analysis in toxicology. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 42, n. 11, p. 1265-1272, 2004.

VILLAMOR, J.L. et al. A new GC-MS method for the determination of five amphetamines in human hair. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 135-139, 2005.

VOGLIARDI, S. et al. Sample preparation methods for determination of drugs of abuse in hair samples: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 857, p. 1-27, 2015.

WELCH, M.J. et al. Hair analysis for drugs of abuse: evaluation of analytical methods, environmental issues, and development of reference materials. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 17, n. 7, p. 389-398, 1993.

WELCH, M.J.; SNIEGOSKI, L.T.; TAI, S. Two new standard reference materials for the determination of drugs of abuse in human hair. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 8, p. 1205-1211, 2003.

XIONG, J. et al. Simultaneous quantification of amphetamines, caffeine and ketamine in urine by hollow fiber liquid phase microextraction combined with gas chromatography-flame ionization detector. **Talanta**, v. 82, n. 3, p. 969-975, 2010.

YEGLES, M.; WENNING, R. Opioids Testing in Hair. In: KINTZ, P. (Ed.). **Analytical and practical aspects of drug testing in hair**. United States: CRC Press, 2007. cap 3, p. 73-94.

WHO. World Health Organization. **Drug use and road safety: a policy brief.** Switzerland: Geneva, 2016.

ANEXOS

Anexo A – Parecer do CEP da FCF-USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Desenvolvimento de método de triagem de substâncias psicoativas em amostras de cabelo através de técnicas imunológicas

Pesquisador: Mauricio Yonamine

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 40754715.4.0000.0067

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 978.855

Data da Relatoria: 08/02/2015

Apresentação do Projeto:

O projeto destina-se ao mestrado da aluna Flavia Lopes Roveri da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e pretende-se desenvolver um método de triagem de substâncias psicoativas a partir do fio de cabelo. Serão convidados 60 participantes, todos pessoas usuárias de uma Clínica de reabilitação de usuários de drogas e maiores de 18 anos. O método de análise será desenvolvido a partir de um kit comercial disponibilizado para testar amostras em sangue. O anonimato dos participantes será preservado de acordo com a técnica descrita para coleta e armazenamento dos fios de cabelo. Serão testadas várias substâncias psicoativas tais como anfetaminas, opiáceos, benzodiazepínicos, barbitúricos, cocaína e THC.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo principal é desenvolver uma metodologia para avaliação de substâncias psicoativas em fio de cabelo, a partir de um kit já disponível para avaliação destas substâncias no sangue.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos relacionados à coleta da amostra de fios de cabelo e os benefícios indiretos, porém extensíveis à todos os potenciais usuários destes exames, por se tratar de um método utilizando uma amostra mais facilmente coletável.

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
 Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfci@usp.br

FACULDADE DE CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 978.855

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante para a área de estudo e pode trazer benefícios para a população que necessite ser submetida a exames toxicológicos de detecção de substâncias psicoativas. O projeto é claro, bem delineado, com critérios de inclusão e exclusão bem definidos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 10 de Março de 2015

Assinado por:
Valentina Porta
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Lineu Prestes, 580, Bloco 13A, sala 112
Bairro: Butantã CEP: 05.508-000
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-3622 Fax: (11)3031-8986 E-mail: cepfctf@usp.br

Anexo B – Questionário aplicado aos doadores das amostras de cabelo.**1. Identificação da amostra:**

Nº _____

2. Data de coleta da amostra:

_____/_____/_____

3. Dados Pessoais

Sexo: (____). Masculino; (____). Feminino.

Idade: _____anos.

4. Substâncias utilizadas nos últimos meses:(____) Cocaína (Cocaína em pó, *Crack*);

(____) Maconha;

(____) Haxixe (cigarro de maconha e cocaína);

(____) Remédios para emagrecer;

(____) Anfetamina (“rebite”);

(____) Metanfetamina (“ice”);

(____) Ecstasy (“balas”);

(____) Benzodiazepínicos (rivotril, medicamentos para dormir);

(____) Fenobarbital (Gardenal).

Caso afirmativo, informe o período e frequência de uso (p ex. quantas vezes ao dia e por quanto meses/anos):

5. Outros medicamentos (para gripe, dor de cabeça, etc.).

Anexo C – Histórico escolar

Janus - Sistema Administrativo da Pós-Graduação

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 9030790/2 - Flávia Lopes Roveri

Email: flavia_rov@usp.br
 Data de Nascimento: 05/05/1988
 Cédula de Identidade: RG - 43.696.634-7 - SP
 Local de Nascimento: Estado de São Paulo
 Nacionalidade: Brasileira
 Graduação: Farmacêutico - Centro Universitário São Camilo - São Paulo - Brasil - 2010

Curso: Mestrado
 Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
 Data de Matrícula: 01/07/2014
 Início da Contagem de Prazo: 01/07/2014
 Data Limite para o Depósito: 02/01/2017
 Orientador: Prof(a). Dr(a). Maurício Yonamine - 01/07/2014 até o presente. Email: yonamine@usp.br
 Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 01/07/2014
 Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 17/07/2015
 Data do Depósito do Trabalho:
 Título do Trabalho:
 Data Máxima para Aprovação da Banca:
 Data de Aprovação da Banca:
 Data Máxima para Defesa:
 Data da Defesa:
 Resultado da Defesa:
 Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 01/07/2014

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 6542 em vigor a partir de 20/04/2013).

Última ocorrência: Prorrogação em 28/11/2016

Impresso em: 03/12/2016 09:11:08

9141 - 9030790/2 - Flávia Lopes Roveri

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5741-6/2	Análise Toxicológica de Fármacos e Drogas que Causam Dependência (1)	10/03/2014	13/04/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5803-3/4	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	05/08/2014	18/08/2014	30	0	-	-	N	Turma cancelada
FBC5802-3/5	Tópicos Avançados em Toxicologia I	05/08/2014	17/11/2014	15	1	90	A	N	Concluída
FBC5729-7/2	Fundamentos Básicos da Avaliação do Risco Oferecido por Substâncias Químicas	19/08/2014	15/09/2014	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5818-1/2	Neurotoxicidade Provocada por Xenobióticos e sua Relação com Doenças Neurodegenerativas	29/09/2014	02/11/2014	45	3	100	A	N	Concluída
TNM5801-2/5	Princípios e Aplicações da Espectrometria de Massas (Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - Universidade de São Paulo)	26/02/2015	20/05/2015	120	8	90	A	N	Concluída
FBC5803-3/5	Sistemas de Garantia da Qualidade em Laboratórios de Ensaio	24/03/2015	06/04/2015	30	2	75	A	N	Concluída
FBA5728-3/11	Aprimoramento Didático	14/04/2015	11/05/2015	60	4	85	A	N	Concluída
Participou da Etapa de Estágio Supervisionado em Docência do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino junto à Disciplina FBC0520 Análises Toxicológicas, ministrada aos alunos de graduação do curso de Farmácia e Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (2)									
	Atividade do Programa	03/08/2015	07/12/2015	-	3	-	-	-	-

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito da dissertação	
Disciplinas:	0	25	29
Estágios:			
Total:	0	25	29

Créditos Atribuídos à Dissertação: 71

Observações:

- 1) Disciplina(s) cursada(s) isoladamente e aceita(s) pelo(a) orientador(a) do(a) candidato(a).
 2) Créditos atribuídos de acordo com o disposto na Portaria GR-3588 e GR-4391 - PAE, de 31.08.09 e aprovados pela Comissão de Pós-Graduação, em Sessão de 10/08/2016.

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.
 Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Anexo D – Currículos Lattes**Dados pessoais**

Nome Flávia Lopes Roveri
Citações bibliográficas ROVERI, F. L.
Nascimento 05/05/1988 - Jundiaí/SP – Brasil

End. profissional Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Avenida Professor Lineu Prestes, 580
 Butantã - São Paulo
 05508000, SP - Brasil
 Telefone: 11 30912194

Endereço eletrônico flavia_rov@hotmail.com / flavia_rov@usp.br

Formação acadêmica/titulação

2014 Mestrado em Toxicologia e Análises Toxicológicas
 Universidade de São Paulo - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, USP - FCF, Brasil
 Título: Desenvolvimento de método de triagem de substâncias psicoativas em amostras de cabelo através de técnicas imunológicas
 Orientador: Prof. Dr. Mauricio Yonamine
 Bolsista do (a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Palavras-chave: cabelo, triagem, drogas de abuso, imunoensaio
Áreas do conhecimento: Análise Toxicológica

2007 - 2010 Graduação em Farmácia
 Centro Universitário São Camilo, CUSC, São Paulo, Brasil
 Título: A importância de métodos analíticos confiáveis no controle antidopagem, Ano de obtenção: 2010
 Orientador: Luciane Maria Ribeiro Neto

Formação complementar

2016 – 2016 Operação e manutenção básica de sistema HPLC (Sistema e Software - Shimadzu. (Carga horária: 16h). SINC DO BRASIL, Brasil.

2015 - 2015 Princípios e Aplicações da Espectrometria de Massas
 IPEN – USP, Brasil

2014 - 2014 Curso de curta duração em Análise Multivariada de Dados
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Brasil.

2013 - 2013 Curso de curta duração em Curso básico de Excel
 Excel Experts EX2, Brasil.

- 2011 - 2011** Curso de curta duração em *Semi Intensive English Program*
ELS - *Language Centers*, ELS, Estados Unidos.
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Auditor Interno ISO 9001:2008
SGS Brasil - *SGS Academy*, SGS, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Auditor Interno ISO 17025:2005
SGS Brasil - *SGS Academy*, SGS, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Cromatografia Líquida
Instituto Internacional de Cromatografia, IIC, São Carlos, Brasil
- 2011 - 2011** Curso de curta duração em Cromatografia Gasosa
Instituto Internacional de Cromatografia, IIC, São Carlos, Brasil

Atuação profissional

1. Universidade de São Paulo - Faculdades de Ciências Farmacêuticas

2014 – Atual Mestrado acadêmico – Bolsista CAPES

2. Laboratório de Análises Toxicológicas - LAT USP

2013 – 2014 Enquadramento funcional: Técnica de Laboratório I
Carga horária: 40 - dedicação exclusiva
Outras informações: atividades relacionadas do Sistema de Gestão da Qualidade (ISO 17025:2005 e PALC 2013)

3. TÓXIKON - Assessoria Toxicológica

2010 – 2010 Enquadramento funcional: Estagiária
Carga horária: 30 - regime parcial

4. SOBAM - Centro Médico Hospitalar

2012 – 2013 Enquadramento funcional: Farmacêutica
Carga horária: 36 - dedicação exclusiva
Outras informações: desempenho de funções nas áreas de assistência e atenção farmacêutica.

5. Centro Universitário São Camilo – CUSC

2010 - 2010 Enquadramento funcional: Iniciação científica
Carga horária: 8 - regime parcial
Outras informações: projeto de iniciação científica - "Investigação da presença de cafeína em amostras de café descafeinado empregando espectrofotometria"

- 2009 - 2009** Enquadramento funcional: Iniciação científica
Carga horária: 8 - regime parcial
Outras informações: projeto de iniciação científica - "Avaliação da equivalência farmacêutica entre medicamentos comercializados no mercado brasileiro contendo Ibuprofeno"
- 2008 - 2008** Enquadramento funcional: Monitoria
Carga horária: 6 - regime parcial
Outras informações: monitoria da disciplina de matemática
- 2008 - 2008** Enquadramento funcional: Monitoria
Carga horária: 6 - regime parcial
Outras informações: monitoria das aulas práticas da disciplina de Controle de Qualidade Físico-Químico.

Projetos

- 2014 – Atual** Desenvolvimento de método de triagem de substâncias psicoativas em amostras de cabelo através de técnicas imunológicas

Descrição: Atualmente, o cabelo é reconhecido como a terceira principal matriz biológica para análise de substâncias psicoativas, precedida da urina e do sangue. Isto ocorre principalmente devido ao seu amplo período de detecção, o qual permite estimar um perfil cronológico de consumo de acordo com o comprimento de cabelo analisado. Objetivando maior praticidade, as análises toxicológicas de drogas de abuso podem ser conduzidas adotando-se técnicas de triagem (screening) seguidas por técnicas confirmatórias para os resultados positivos. No presente projeto, será desenvolvido um método de triagem para substâncias psicoativas em cabelo a partir da adaptação do *kit* para imunoensaio em sangue DOA I WB P com a tecnologia Biochip - Randox Laboratórios®. A adaptação do *kit* de imunoensaio é promissora por compreender alguns dos requisitos básicos para métodos de triagem estabelecidos pela Society of Hair Testing (SOHT), incluindo, reatividade cruzada com o fármaco inalterado e seus produtos de biotransformação e alta sensibilidade destes ensaios. As análises serão realizadas para as classes das anfetaminas, opiáceos, benzodiazepínicos, barbitúricos, cocaína e tetraidrocanabinol. De acordo com as características físico-químicas das substâncias de interesse processos de amostragem, descontaminação, digestão da amostra e extração serão otimizados. Os ensaios imunológicos serão avaliados a partir da análise de amostras de pacientes expostos às substâncias psicoativas de interesse, segundo parâmetros como sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo, exatidão, limite de detecção e precisão, e por comparação com a técnica confirmatória de cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS).

Situação: Em andamento (projeto de pesquisa)

Integrantes: Flávia Lopes Roveri (responsável); Mauricio Yonamine; Beatriz Aparecida Passos Bismara Paranhos

2009 - 2011 Avaliação da aplicação de método espectrofotométrico para determinação do teor de ibuprofeno em diferentes formas farmacêuticas

Descrição: O anti-inflamatório ibuprofeno é encontrado em diferentes formas farmacêuticas intercambiáveis. O objetivo do estudo foi determinar o teor de ibuprofeno, empregando espectrofotometria, para comparação das formulações comercializadas

Situação: Concluído (projeto de pesquisa)

Alunos envolvidos: Graduação

Integrantes: Flávia Lopes Roveri (responsável); Luciane Gomes Faria; Luciane Maria Ribeiro Neto; Alessandro Silva

2009 - Atual Aplicação da espectrofotometria na investigação da presença de cafeína em amostras de café descafeinado

Descrição: Este trabalho objetivou aplicar a espectrofotometria na investigação de cafeína em cafés descafeinados disponíveis no mercado brasileiro e comparar estes resultados com os obtidos para os demais tipos de café

Situação: Em andamento (projeto de pesquisa)

Alunos envolvidos: Graduação

Integrantes: Flávia Lopes Roveri; Luciane Gomes Faria; Luciane Maria Ribeiro Neto (responsável); Alessandro Silva

Revisor de periódico

2016 – atual: Biomedical Chromatography

2016 – atual: F1000Research

Idiomas

Inglês: Compreende bem, fala bem, escreve bem, lê bem

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. ROVERI, F. L.; FARIA, L. G.; RIBEIRO NETO, L. M.; SILVA, A. Avaliação da aplicação de método espectrofotométrico para determinação do teor de ibuprofeno em diferentes formas farmacêuticas. **Revista Brasileira de Farmácia / Brazilian Journal of Pharmacy**, v.2, p.186, 2012.

2. ROVERI, F.L.; PARANHOS, B.A.P.B.; YONAMINE, M. Determination of phenobarbital in hair matrix by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Forensic Science International JCR**, v. 265, p. 75-80, 2015

Trabalhos Técnicos

- ROVERI, F. L.; YONAMINE, M. Referee report for: Teaching and learning based on peer review: a realistic approach in forensic sciences. 2016.

Resumos publicados em anais de congressos

- ROVERI, F.L.; YONAMINE, M. Determination of opiates in real and reference samples hair samples by solid phase extraction (SPE) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). In: XII Latin-American Regional Meeting 2016. San José, 2016.
- PEGO, A.M.F.; ROVERI, F.L.; YONAMINE, M. Determination of cocaine, benzoilecgonine and cocaethylene in hair samples using liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). In: 54th Annual meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) 2016. Brisbane, 2016.
- ROVERI, F. L.; YONAMINE, M. Solid phase extraction (SPE) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) applied for determination of opioids in hair matrix.. In: 54th Annual meeting of the International Association of Forensic Toxicologists (TIAFT) 2016. Brisbane, 2016.
- OLIVEIRA, C. D. R.; FRUCHTENGARTEN, L. V.; LODDI, S.; ZUCOLOTO, A. D.; SILVEIRA, G. O.; ROVERI, F. L.; YONAMINE, M.; HERNANDEZ, E. M. M. Cocaine Poisoning in a newborn confirmed by toxicological analysis in four biological matrices: case report. In: 9th Congress of Toxicology in Developing Countries - CTDC9/ XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia - CBTOX, 2015. Natal, 2015.
- ROVERI, F. L.; PARANHOS, B.A.P.B ; MARTINS, W. V. ; YONAMINE, M. . Development of screening method for the detection of psychoactive substances in hair samples using immunological techniques. In: 9th Congress of Toxicology in Developing Countries - CTDC9 / XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia - CBTOX, 2015, Natal, 2015.
- ROVERI, F. L.; PARANHOS, B.A.P.B.; YONAMINE, M. Determination of barbiturates in hair matrix by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). In: TIAFT - 53rd Annual Meeting of The International Association of Forensic Toxicologists 2015 – Florença, 2015.

- ROVERI, F. L.; PARANHOS, B.A.P.B.; YONAMINE, M. Development of an immunochemical screening test for detection of drugs in hair samples. In: TIAFT - 52nd Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists 2014 - Buenos Aires, 2014.
- ROVERI, F. L. ; FARIA, L. G. ; SILVA, A. ; RIBEIRO NETO, L. M. . The assesement of application of spectrophotometric method for determination of ibuprofen in different pharmaceutical forms. In: XVI Congresso Paulista de Farmacêuticos 2010 - São Paulo, 2010.

Apresentações

- “*Deteccção de canabinoides em cabelo por SPME e GC-MS*” no curso de toxicologia analítica do ciclo de cursos e palestras em toxicologia da SBTOX. 2015. (aula).
- “*Toxicologia Forense*” em X Semana da Farmácia da Faculdade Padre Anchieta. 2016. (palestra).
- “*Toxicologia Analítica – Linhas de pesquisa*” em IV Escola de Inverno em Toxicologia FCF-USP. 2015. (palestra).
- “*O Farmacêutico e a Toxicologia Forense*” em VII Semana da Farmácia da Universidade Cruzeiro do Sul. 2015. (palestra).
- “*Álcool e outras substâncias depressoras do sistema nervoso central*” em I Curso de Extensão em Toxicologia Forense FCF-USP. 2015. (palestra).
- “*Análises Toxicológicas: Perspectivas de atuação para o Farmacêutico*” em XVIII Congresso Farmacêutico de São Paulo. Seminário de Análises Clínicas e Toxicológicas. 2015.

Eventos

- Apresentação Oral – categoria jovem cientista - *Determination of opiates in real and reference samples hair samples by solid phase extraction (SPE) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)* no **XII TIAFT Latin-American Regional Meeting. 2016.** (Congresso)
- Apresentação de Pôster - *Development of screening method for the detection of psychoactive substances in hair samples using immunological techniques* no **9th Congress of Toxicology in Developing Countries - CTDC9/ XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia - CBTIX.** 2015. (Congresso).
- Apresentação de Pôster - *Cocaine Poisoning in a newborn confirmed by toxicological analysis in four biological matrices: case report* no **9th Congress of Toxicology in Developing Countries - CTDC9/ XIX Congresso Brasileiro de Toxicologia - CBTIX.** 2015. (Congresso).

- **XVIII Congresso Farmacêutico de São Paulo. Seminário de Análises Clínicas e Toxicológicas.** 2015. (Congresso).
- **VI Simpósio de Pós-Graduação em Análises Clínicas - SIMPAC e I International Symposium on Pathophysiology and Toxicology.** 2015. (Simpósio)
- Apresentação de Pôster - *Determination of barbiturates in hair matrix by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography mass spectrometry (GC-MS)* no **53° Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists - TIAFT**, 2015. (Congresso)
- **20º Encontro da Society of Hair Testing - SOHT**, 2015. (Encontro)
- Apresentação de Pôster - *Development of an immunochemical screening test for detection of drugs in hair samples* no **52° Annual Meeting of the International Association of Forensic Toxicologists - TIAFT**, 2014. (Congresso)
- Apresentação de Pôster - *Aplicação da Espectrofotometria na investigação da presença de cafeína em amostras de café descafeinado* na **XIV Jornada Científica - CUSC**, 2010. (Exposição)
- Apresentação de Pôster - *The assessment of application of spectrophotometric method for determination of ibuprofen in different pharmaceutical forms* no **XVI Congresso Paulista de Farmacêuticos**, 2010. (Congresso)
- **Conferência Municipal de Saúde Mental**, 2010. (Seminário)
- Apresentação de Pôster - *Avaliação da aplicação de método espectrofotométrico para determinação do teor de ibuprofeno em diferentes formas farmacêuticas* no **CONIC - Congresso Nacional de Iniciação Científica**, 2009. (Congresso)
- **VI Semana da Farmácia VI**, 2009. (Encontro)
- **X International Congress of Ethnopharmacology**, 2008. (Congresso)

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

- **ROVERI, F. L.** I Curso de extensão em Toxicologia Forense. 2015.

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/6286248782557057>

Anexo E – Publicação de Artigo Científico

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forensi

Determination of phenobarbital in hair matrix by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)

Flávia Lopes Roveri^{*}, Beatriz Aparecida Passos Bismara Paranhos, Mauricio Yonamine

Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, São Paulo, Brazil

Contents lists available at ScienceDirect

Forensic Science International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/forensi

Determination of cocaine and its derivatives in hair samples by liquid phase microextraction (LPME) and gas chromatography–mass spectrometry (GC–MS)

A.M.F. Pego^{a,*}, F.L. Roveri^a, R.Y. Kuninari^a, V. Leyton^b, I.D. Miziara^{b,c}, M. Yonamine^a

^a *Department of Clinical and Toxicological Analyses, Faculty of Pharmaceutical Sciences, São Paulo University, São Paulo, Brazil*

^b *Department of Legal Medicine, Ethics and Occupational Health, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil*

^c *Institute of Legal Medicine of São Paulo, São Paulo, Brazil*